

Aus dem Institut für Medizinische Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Eingereicht über das Institut für Virologie, Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Verlaufskontrolle von
Flavivirusinfektionen in Deutschland
am Beispiel des GB-Virus C**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von
Gabi Hauptmann**

Gießen 2001

Aus dem Institut für Medizinische Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H. W. Gerlich

**Eingereicht über das Institut für Virologie, Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. H.-J. Thiel

**Verlaufskontrolle von
Flavivirusinfektionen in Deutschland
am Beispiel des GB-Virus C**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von
Gabi Hauptmann
Tierärztin aus Gießen (Hessen)**

Gießen 2001

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. W. Gerlich

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2001

Inhaltsverzeichnis

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen

1 Einleitung und Literaturüberblick zu GB-Virus-C 1-14

1.1	Entdeckung	1
1.2	Taxonomie	2
1.3	Aufbau der GB-Viren	4
1.4	Nachweismethoden.....	8
1.5	Klinische Bedeutung	9
1.6	Epidemiologie und Übertragung.....	10
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	14

2 Material und Methoden 15-38

2.1	Patientenkollektiv	15
2.1.1	Zusammensetzung und Herkunft des Kollektivs der Vorstudie.....	15
2.1.2	GBV-C-RNA- und GBV-C-E2-Antikörper-Befunde der Vorstudie	15
2.1.3	Beschaffung der Proben für die Nachuntersuchung.....	17
2.2	Nachweis von GBV-C-RNA.....	18
2.2.1	Vermeiden von Kontaminationen	18
2.2.2	Kontrollen	19
2.2.3	Extraktion.....	20
2.2.4	Reverse Transkription.....	22
2.2.5	Amplifikation	25
2.2.6	Detektion	31
2.3	Nachweis von GBV-C-E2-Antikörpern.....	35

3	Ergebnisse	39-66
3.1	Patientenkollektiv der Vorstudie und der Nachuntersuchung	39
3.1.1	Verbleib	39
3.1.2	Zusammensetzung des Patientenkollektivs bei der Vorstudie und bei der Nachuntersuchung	40
3.1.2.1	Alter	41
3.1.2.2	Geschlecht	42
3.1.2.3	Dialysedauer	42
3.1.2.4	Transfusionshäufigkeit	43
3.1.2.5	Infektionsstatus	44
3.2	GBV-C-Befunde der Nachuntersuchung	45
3.2.1	Untersuchung auf GBV-C-RNA	45
3.2.1.1	Ergebnis der ersten Untersuchung auf GBV-C-RNA	45
3.2.1.2	Ergebnis der Nachtestungen	47
3.2.1.3	Endgültiges Ergebnis der Untersuchung auf GBV-C-RNA	48
3.2.2	Untersuchung auf GBV-C-E2-Antikörper (Anti-E2)	49
3.2.2.1	Ergebnis der ersten Untersuchung auf Anti-E2	49
3.2.2.2	Ergebnis des Bestätigungstests	50
3.2.2.3	Ergebnis der Nachtestungen	51
3.2.2.4	Endgültiges Ergebnis der Untersuchung auf Anti-E2	51
3.3	Verlaufskontrolle von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten	53
3.3.1	Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten mit GBV-C-Virämie ohne E2-Antikörper (Gruppe I)	53
3.3.1.1	Häufigkeit des Verschwindens der GBV-C-Virämie	53
3.3.1.2	Einflußfaktoren bei der Serokonversion	54
3.3.2	Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten mit GBV-C-Virämie und E2-Antikörpern (Gruppe II)	56
3.3.3	Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten mit GBV-C-E2-Antikörpern, aber ohne Virämie (Gruppe III)	56
3.3.3.1	Dauer der Nachweisbarkeit von Antikörpern gegen GBV-C-E2	57
3.3.3.2	Einflußfaktoren auf die Dauer der E2-Antikörper-Nachweisbarkeit	57

4 Diskussion 67-78

4.1	Untersuchtes Kollektiv	67
4.2	Nachuntersuchung bei Patienten mit GBV-C-Virämie ohne E2-Antikörper	68
4.2.1	Durchschnittliche Dauer der Virämie	69
4.3	Nachuntersuchung bei Patienten mit GBV-C-Virämie und E2-Antikörpern	71
4.4	Nachuntersuchung bei Patienten mit GBV-C-E2-Antikörpern, aber ohne Virämie	72
4.5	Typischer Verlauf der GBV-C-Infektion	75
4.6	Neuinfektionen	75
4.6.1	Übertragungswege	76

5	Zusammenfassung	79
6	Summary	80
7	Literaturverzeichnis	81-90

Verzeichnis der Abkürzungen

AS	Aminosäuren
ALT	Alanin-Amino-Transferase
bp	Basenpaare
BVDV	Bovine viral diarrhea virus
cDNA	Komplementäre DNA
cp	zytopathogen
C-Protein	Core-Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
E-Protein	Envelope-Protein
E ^{RNS} -Protein	E-Protein mit RNase-Aktivität
GBV-A	GB Virus Typ A (GB = Initialen)
GBV-B	GB Virus Typ B
GBV-C	GB Virus Typ C
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (=ALT)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HGV	Hepatitis-G-Virus
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
i.v.	intravenös
IRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
M-Protein	Membran-Protein
NCR	Nichtkodierende Region
noncp	nichtzytopathogen
N ^{PRO}	Nichtstrukturprotein mit Proteaseaktivität

NS	Nichtstruktur (Protein)
nt	Nukleotid
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphate buffered solution
PCR	Polymerase chain reaction
Pre-M-Protein	Precursor Matrix-Protein
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach Reverser Transkription
YFV	Yellow fever virus/Gelbfiebertvirus

1 Einleitung und Literaturüberblick zu GB-Virus-C

1.1 Entdeckung

Auf der Suche nach parenteral übertragbaren Hepatitisserregern hat Friedrich Deinhardt schon 1964 Tamarinaffen experimentell mit Serum von einem Patienten mit den Initialen G. B., der an einer ungeklärten chronischen Hepatitis litt, infiziert. Diese Affen reagierten mit einem Anstieg des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum als Zeichen einer Leberentzündung. Jedoch war eine Virusidentifizierung mit damaligen Mitteln noch nicht möglich. Allerdings wurden die Seren von dem Patienten GB und der Affen mit dem sogenannten **GB-Agens** eingefroren und aufbewahrt [Abbott Mitteilung, „Reverenz an Prof. F. Deinhardt“, 1996].

Nach Identifizierung des Hepatitis-C-Virus (HCV), welches für 80-90 % der transfusionsassoziierten NonA-NonB-Hepatitis verantwortlich gemacht werden konnte, war die Ursache von immer noch 10-20 % solcher Hepatitis ungeklärt. Simons und Mitarbeitern [1996b] gelang es, RNA-Genome zwei verschiedener Viren, GB-Virus-Typ A (**GBV-A**) und GB-Virus-Typ B (**GBV-B**), aus Affen zu isolieren, die mit dem GB-Agens infiziert worden waren. Daraufhin versuchten sie, Antikörper gegen diese Viren beim Menschen nachzuweisen. Sie entwickelten mit rekombinanten Proteinen von GBV-A und GBV-B neun verschiedene ELISA's, testeten damit Personen auf Antikörper gegen diese Viren und erhielten positive Ergebnisse. Jedoch mißlang der Versuch, GBV-A oder GBV-B selber mittels RT-PCR aus dem Serum der Personen mit positiven ELISA-Ergebnissen nachzuweisen. Es wurde vermutet, daß die positiven Ergebnisse durch eine Kreuzreaktion mit einem ähnlichen Virus zustande gekommen sein könnten. Tatsächlich konnte mit degenerierten Primern aus der konservierten NS3-Region ein Produkt hergestellt werden, dessen Sequenz große Ähnlichkeit mit Sequenzen von GBV-A, GBV-B und HCV aufwies. Es wurde als GB-Virus-Typ C (**GBV-C**) bezeichnet [Simons et al., 1996b].

Unabhängig davon wurde ein Virus aus einem Patienten mit chronischer, virusbedingter Hepatitis, die angeblich nicht durch die bisher bekannten Hepatitisviren A–E verursacht worden ist (Non-A-E-Hepatitis), isoliert. Dieses Virus wurde Hepatitis-G-Virus (**HGV**) genannt [Linnen et al., 1996].

Ein Vergleich der Sequenzen von 331 Nukleotiden aus der NS3-Region von HGV und GBV-C ergab eine 85,5 % ige Nukleotid- und eine 100 % ige Aminosäurenidentität. Es stellte sich heraus, daß es sich bei GBV-C und HGV um verschiedene Isolate derselben Virusart handelt [Okamoto et al., 1997]. Wir verzichten auf die Bezeichnung HGV aufgrund des bisher fehlenden Beweises des kausalen Zusammenhangs mit einer Hepatitis und verwenden im folgenden nur noch die Bezeichnung GBV-C.

1.2 Taxonomie

Aufgrund des Genomaufbaus werden die GB-Viren der Familie der Flaviviridae zugeordnet. Die wichtigsten Vertreter der Flaviviridae zeigt Tabelle 1.1. Eine offizielle Zuordnung von GBV-C in ein Genus existiert noch nicht. Entweder bilden die GB-Viren ein eigenes Genus oder sie werden gemeinsam mit HCV dem Genus Hepacivirus zugeordnet.

Tab. 1.1: Charakteristische Vertreter der Flaviviridae

Genus	Spezies
Flavivirus	Louping Ill Virus (Schaf ¹) Wesselsbron Virus (Schaf ¹) Japanisches Enzephalitis Virus (Schwein ¹) Frühsommer Meningoenzephalitis Virus (Mensch ²) Gelbfieber Virus (Mensch ²) Dengue Virus Typ 1-4 (Mensch ²)
Pestivirus	Virus der bovinen Diarrhöe 1 Virus der bovinen Diarrhöe 2 Virus der klassischen Schweinepest Border Disease Virus der Schafe
Hepacivirus	Hepatitis C Virus, Genotypen 1-6 (Mensch)
noch nicht zugeordnet	GB Virus Typ A (Affen) GB Virus Typ B (Affen) GB Virus Typ C (Mensch)

¹ Zoonoseerreger; ² die genannten Flaviviren des Menschen werden durch Arthropodenvektoren übertragen und infizieren auch verschiedenste Vertebraten

Die phylogenetische Analyse zeigt, daß GBV-C eng mit GBV-A und weniger eng mit den anderen Vertretern der Flaviviridae verwandt ist (Abb. 1.1). Sie besitzen beide eine ähnliche Genomstruktur (s.u.) und sind nicht hepatotrop. GBV-B dagegen verursacht in Neuweltaffen eine Hepatitis und ist enger verwandt mit HCV als mit GBV-A und GBV-C. Die Genomstruktur von GBV-B ähnelt der von HCV, insbesondere darin, daß ein Gen für das Core-Protein vorhanden ist [Robertson et al., 1998].

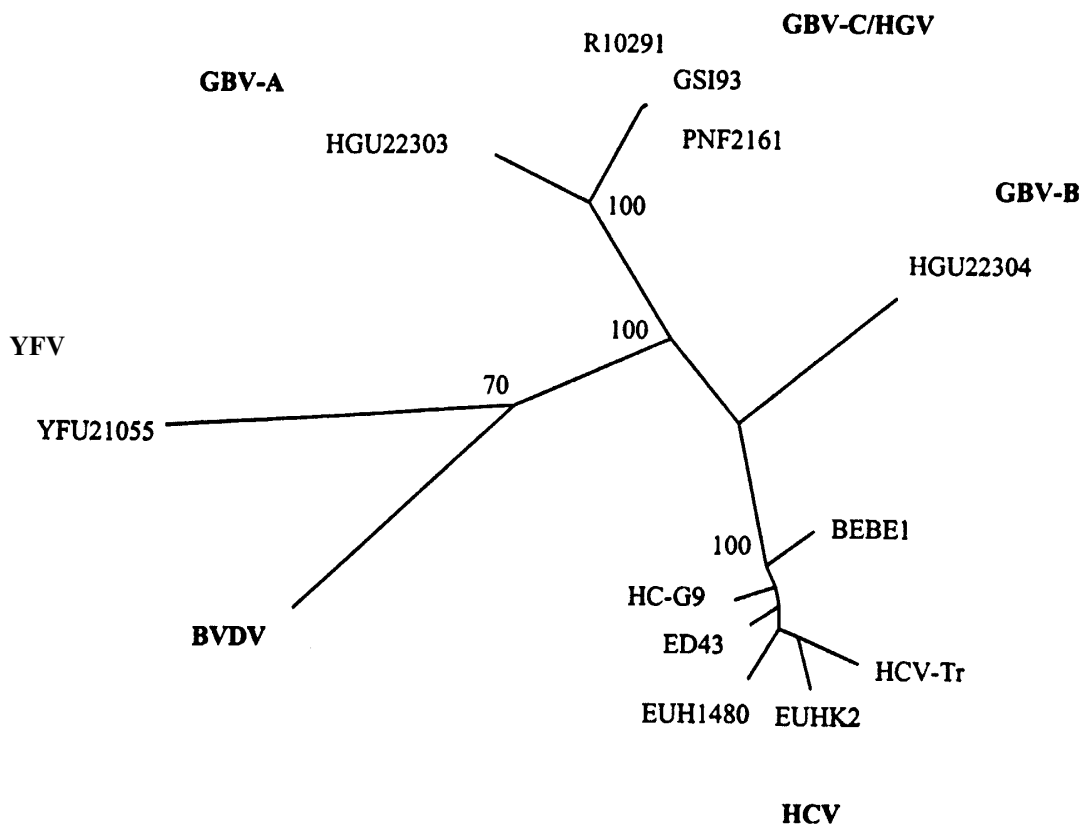


Abb. 1.1: Phylogenetische Analyse der Helikase-Region von verschiedenen Mitgliedern der Flaviviridae [Robertson et al., 1998]

Die Aminosäuresequenzen der GB-Viren wurden mit repräsentativen Hepaciviren, dem Virus der bovinen Virusdiarrhöe (BVDV) und dem Gelbfieberevirus (YFV) verglichen.

Zur Einteilung in Geno- und Subtypen auf der Basis von Sequenzunterschieden existieren verschiedene Studien. Während anfänglich GBV-C von zwei Hauptgruppen [Zanella et al., 1996] über drei Gruppen [Kao et al., 1996] bis zu fünf Genotypen [Muerhoff et al., 1996a] eingeteilt wurde, sahen andere Autoren keinen Beweis für eine Gruppierung in verschiedene Geno- oder Subtypen und sprachen nur von einem Genotyp [Ibanez et al., 1998; Lim et al., 1997; Thomas et al., 1997; Wang et al., 1997]. Eine Vielzahl von Autoren berichten von drei Genotypen [Kondo et al., 1997; Mukaide et al., 1997; Karayiannis et al., 1998; Cong et al., 1999]. Typ 1 soll sich vorwiegend in Westafrika, Typ 2 in Europa und Nordamerika und Typ 3 in Asien [Muerhoff et al., 1996b] finden. Quarleri und Mitarbeiter [1997] unterteilt diese drei Genotypen nochmals in 1a, 1b, 2a, 2b, und 3.

Kürzlich wurden in Südafrika [Sathar et al., 1999], in Vietnam und Myanmar [Naito et al., 1999], in Spanien [LopezAlcorocho et al., 1999] und in Japan [Takahashi et al., 1997] weitere Isolate gefunden, die sich nicht den bisher bekannten Genotypen zuordnen lassen.

Letztendlich sind einige Autoren der Meinung, daß einzelne, kleine, subgenomische Fragmente für eine Genotypisierung nicht ausreichen könnten [Takahashi 1997; Cong et al., 1999].

1.3 Aufbau der GB-Viren

Über die Viruspartikel der GB-Gruppe ist bisher wenig bekannt, da nur die Genome der GB-Viren isoliert wurden. In Analogie zu allen anderen Arten der Flaviviridae hat GBV-C vermutlich ein sphärisches Capsid und ist von einer Hüllmembran umgeben, in die virale Oberflächenproteine eingelagert sind.

GBV-C besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und, abhängig vom untersuchten Isolat, einer Länge von 9103 [Linnen et al., 1996], 9377 [Simons et al., 1996b], bis 9392 [Kim et al., 1997] Basen. Das Genom enthält wie alle Flaviviridae einen durchgehenden offenen Leserahmen, der für ein Polyprotein kodiert. Dieser Bereich wird von nicht kodierenden Nukleotidsequenzen flankiert. Der nicht kodierende Bereich am 5'-Ende enthält bei GBV-C, HCV und den Pestiviren eine IRES (internal ribosomal entry site). Daher ist dieser Bereich bei GBV-C mit 281 bis 552 Basen, HCV mit 340 Basen und den Pestiviren (BVDV 385 Basen) deutlich länger als bei dem Genus Flavivirus (Gelbfiebertvirus 118 Basen), der am

5'-Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert ist. Generell ist das 3'-Ende bei allen Vertretern der Flaviviridae nicht polyadenyliert.

Aus dem Polyprotein mit 2842 [Simons et al., 1996b] bis 2910 Aminosäuren [Linnen et al., 1996] gehen durch ko- und posttranslationale Spaltungen die einzelnen, funktionell aktiven Struktur- und Nichtstrukturproteine (NS) hervor. Diese Prozessierung erfolgt durch zelluläre und virale Proteasen. Zu den zellulären Proteasen gehört die Signalpeptidase, die an die Membran des endoplasmatischen Reticulums assoziiert ist und im zellulären Stoffwechsel die Signalpeptide von den translatierten Proteinen abspaltet.

Zu den Strukturproteinen, die sich im aminoterminalen Drittel befinden, gehören bei HCV und den Pestiviren das Core-Protein (C-Protein), welches das Capsid bildet, und die Glycoproteine E1 und E2 (envelope), die als Oberflächenproteine in die Hüllmembran eingebaut werden. Ob GBV-C ein C-Protein hat, ist umstritten. Bisher ging man davon aus, daß GBV-C kein C-Protein hat. Allerdings existiert eine Studie von Xiang und Mitarbeitern [1998], in der ein Gen für das C-Protein nachgewiesen wurde. Wie HCV hat GBV-C ein E1- und E2-Hüllprotein. Pestiviren haben zusätzlich eine aminoterminal Protease N^{PRO} und ein drittes Hüllprotein E0, bzw. E^{RNS} . Die Strukturproteine setzen sich beim Genus Flavivirus aus dem Core-Protein und den viralen Membranproteinen Pre-M (precursor Matrix, ein Vorläuferprodukt des M-Proteins) und E zusammen. Das stark hydrophobe carboxyterminale Ende des C-Proteins wirkt bei GBV-C, HCV und den Pestiviren als Signalpeptid für das benachbarte E-Protein und bei den Flaviviren für das Pre-M-Protein. Damit wird die Spaltung des Polyproteins im Bereich der Strukturproteine durch zelluläre Signalpeptidasen induziert.

An die Sequenzen der Strukturproteine schließen sich die Sequenzen der Nichtstrukturproteine beim Genus Flavivirus NS1 bis NS5 an. NS2 und NS4 sind hier nochmals in A und B unterteilt. Bei HCV und den Pestiviren existiert kein NS1-Protein, dafür direkt nach dem E2-Protein ein p7-Protein und keine Unterteilung von NS2, aber zusätzlich eine Unterteilung von NS5 in A und B. Diese Anordnung findet sich auch bei GBV-C, mit dem Unterschied, daß noch kein p7-Protein nachgewiesen wurde und daß NS4 nicht unterteilt ist.

Viren der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) aus dem Genus Pestivirus treten in Form zweier Biotypen auf. Offensichtlich entsteht der zytopathogene (cp) Stamm in einem persistent infizierten Tier durch Mutation aus einem nicht zytopathogenen (noncp)

Stamm. Bisher konnte nur bei den zytopathogenen Stämmen NS3 nachgewiesen werden, während bei nicht zytopathogenen Stämmen NS2-3 nicht meßbar gespalten wird [Meyers und Thiel, 1996]. Daher scheint der zur Entstehung von NS3 führende Prozessierungsschritt für die Zytopathogenität eines cpBVDV Stamms entscheidend zu sein.

NS3 besitzt bei allen Flaviviridae eine Serinprotease-Domäne, aber auch NTPase- und Helikaseaktivität. Bei GBV-C, HCV und den Pestiviren dient NS4A, bei den Flaviviren NS2B, als Cofaktor der NS3-Protease bei der Spaltung des Polyproteins in die Nichtstrukturproteine. Auch NS2 hat als Cystein-Protease bei GBV-C und HCV Proteaseaktivität. Die Abbildung 1.2 zeigt, welche Proteasen an den einzelnen Spaltstellen agieren und die Genomorganisation jeweils eines Vertreters der drei Genera der Flaviviridae und von GBV-C. NS5B repräsentiert bei GBV-C, HCV und den Pestiviren die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Bei den Flaviviren ist dies NS5.

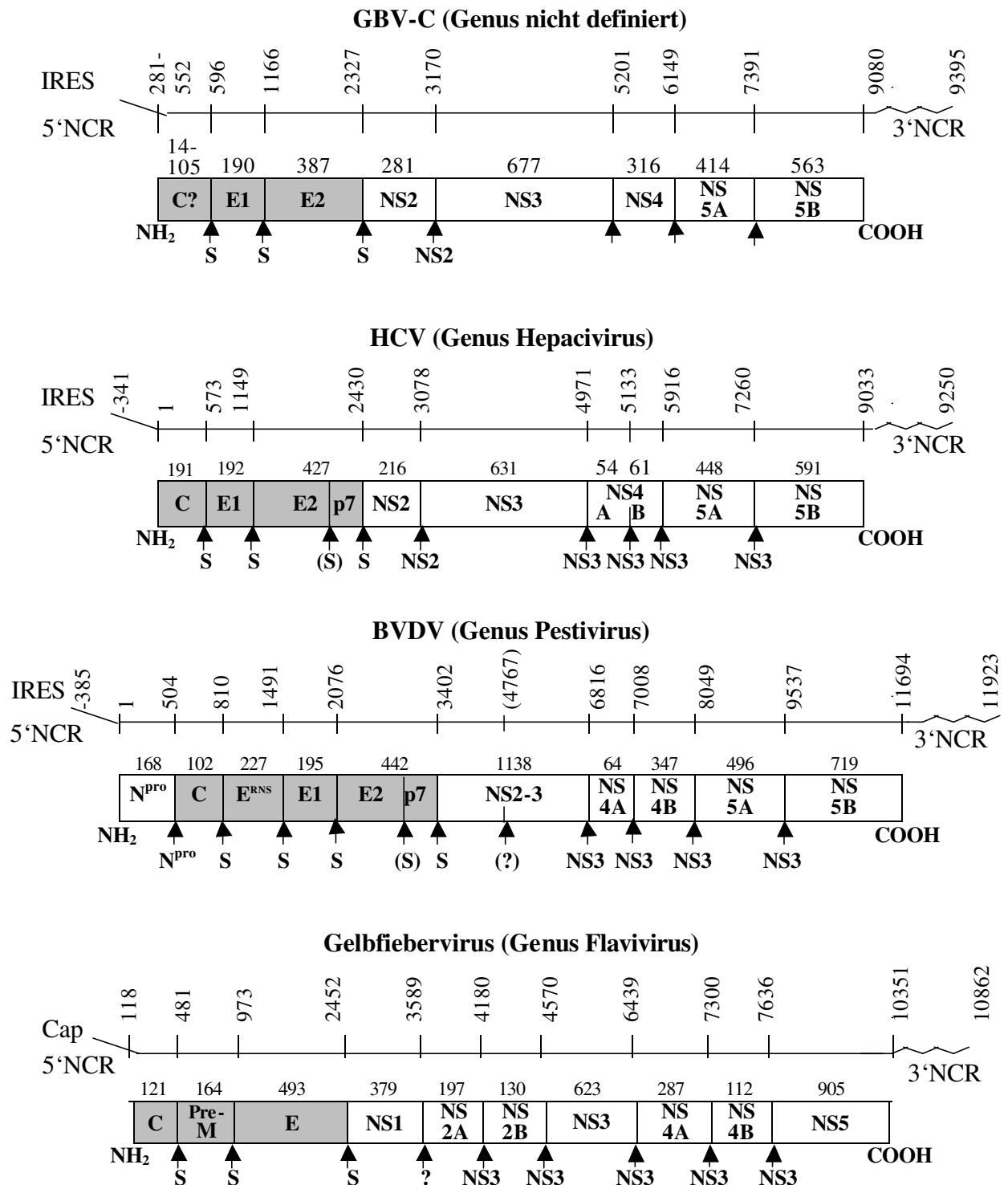


Abb. 1.2: Genomorganisation von GBV-C, HCV, BVDV und Gelbfiebervirus

Abb. ist nicht maßstäblich. Der obere Teil jeder Abbildung zeigt das Genom mit den Zahlenangaben der Nukleotidpositionen, die für die einzelnen Proteine kodieren. Im unteren Teil jeder Abbildung wird das vom Leserahmen kodierte Polyprotein dargestellt. An die Strukturproteine (C=Core-Protein, Pre-M=precursor Matrix, E=Envelope-Protein; E^{RNS}=E-Protein mit RNase-Aktivität) in grau schließen sich die Nichtstrukturproteine (NS) in weißer Farbe an. N^{PRO}=aminoterminal Protease bei Pestiviren. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Aminosäureanzahl der einzelnen Proteine. Unterhalb des Polyproteins sind die für die Spaltung verantwortlichen Enzyme angegeben (zelluläre Enzyme: S=Signalpeptidase, (S)=Spaltung durch Signalpeptidase nicht vollständig, somit Entstehung von E2, p7, E2-p7; Virus-kodierte Enzyme: NS2, NS3; ?=Enzym nicht bekannt). Quelle: aus der Literatur zusammengestellt.

1.4 Nachweismethoden

Der Nachweis einer GBV-C-Virämie, der eine bestehende, chronische Infektion anzeigt, erfolgt mittels eines Nukleinsäureamplifikationstests (z.B. Polymerasekettenreaktion, Ligasekettenreaktion oder Transcription mediated amplification), bei dem bestimmte Abschnitte der Nukleinsäure des Virus stark vermehrt und dann nachgewiesen werden. Entscheidend für die Effektivität des Tests ist die Wahl der verwendeten Primerpaare, die den zu vermehrenden Nukleinsäureabschnitt vorgeben. Bisher sind Primer aus dem am stärksten konservierten Bereich der NS3-Region [Karayiannis et al., 1996; Leary et al., 1996; Simons et al., 1995], der NS5-Region [Schlüter et al., 1996; Viazow et al., 1996], der 5'NCR [Kim et al., 1996; Leary et al., 1996; Linnen et al., 1996; Muerhoff et al., 1996a; Schlüter et al., 1996; Simons et al., 1995] und der Envelope-Region [Panda et al., 1996] verwendet worden.

In einer Studie zum Vergleich der Effektivität der RT-PCR (Polymerasekettenreaktion nach Reverser Transkription) mit verschiedenen Primern aus der 5'NCR-, NS3- und der Envelope-Region erfaßten nur die Primer aus der 5'NCR-Region alle positiven Proben [Kao et al., 1997]. Beim Vergleich von Primern aus der NS3- und der 5'NCR-Region war die Untersuchung mit dem Primerpaar aus der 5'NCR-Region sensitiver [Bhardwaj et al., 1997]. Dies wurde auch in der Studie von Klingelhöfer [Dissertation 1998] beim Vergleich verschiedener Primer bestätigt. Von den verwendeten Primern (zwei aus der NS5-Region [Schlüter et al., 1996; Viazow et al., 1996] und zwei aus der 5'NCR-Region [Schlüter et al., 1996]) erfaßte der weiterentwickelte Primer aus der 5'NCR-Region 96 % der positiven Proben, während die anderen Primer nur 73 % bis 79 % erfaßten. Um alle positiven Proben nachzuweisen, mußten mindestens drei verschiedene Primerpaare verwendet werden. Da in den meisten Studien nur ein Primerpaar verwendet wurde, könnte die Prävalenz von GBV-C noch höher als bisher angegeben liegen. Auch in einer Studie über eine Qualitätskontrolle der RT-PCR konnten nur vier von 14 Labors alle erwarteten Ergebnisse richtig protokollieren [Kunkel et al., 1998].

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis von GBV-C ist das sogenannte LCx-System der Firma Abbott, eine vollautomatisierte LCR (Ligase-Chain-Reaction) [Michel, 1996]. Bei einem Vergleich mit anderen Nachweismethoden wurden mit dem LCx-System alle positiven Proben erfaßt [Simons et al., 1996b].

Der Nachweis der amplifizierten Genomabschnitte erfolgte bisher bei den meisten Untersuchungen durch Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid oder durch Hybridisierung.

Antikörper gegen das E2-Protein von GBV-C können mit einem Enzymimmunoassay (EIA) nachgewiesen werden, der allerdings nach bisherigen Literaturangaben keine bestehende, sondern eine überstandene GBV-C-Infektion anzeigt [Hassoba et al., 1997; Tacke et al., 1997; Pilot-Matias et al., 1996]. Der bisher einzige Antikörpertest stammt von Boehringer Mannheim (µPlate Anti-HGenv®), bei dem qualitativ IgG-Antikörper gegen das E2-Protein nachgewiesen werden.

1.5 Klinische Bedeutung

Die Pathogenität von GBV-C ist noch nicht geklärt. Das Serum des Patienten mit angeblicher Non A-E Hepatitis, aus dem HGV von Linnen 1996 isoliert wurde, stellte sich im nachhinein als anti-HCV positiv heraus. Möglicherweise wurden schon hier falsche Schlüsse über die Pathogenität von GBV-C gezogen. Die Angaben über die Prävalenz von GBV-C bei Patienten mit **akuter oder chronischer Non-A-E Hepatitis** variieren sehr stark (0-100 %) [z.B. Alter HJ et al., 1997; Alter MJ et al., 1997; Haagsma et al., 1997; Sugai et al., 1997, Tacke et al., 1997], aber ob die GBV-C-Infektion die Ursache für die Hepatitiden war, konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden. Weiter wird über das Vorkommen von GBV-C bei **fulminanten Hepatitiden** zwischen 0 % [Moaven et al., 1996] und 50 % [Haydon et al., 1997], bei **Leberzirrhosen** zwischen 5 % [Leon et al., 1996] und 25 % [Panda et al., 1996], bei **hepatozellulären Karzinomen** zwischen 7 % [Linnen et al., 1996] und 38 % [Leon et al., 1996], bei **autoimmunen Hepatitiden** zwischen 5 % [Linnen et al., 1996] und 12,5 % [Heringlake et al., 1996] und bei **aplastischen Anämien** zwischen 50 % [Schmidt et al., 1996] und 60 % [Mantero et al., 1996] berichtet. Die Prozentangaben sind allerdings vorsichtig zu bewerten, da die Zahl der untersuchten Patienten oft sehr klein war.

Da die Patienten häufig mit weiteren Hepatitisviren infiziert waren oder zumindest Angaben darüber fehlten, könnten andere Viren als GBV-C Auslöser der Erkrankungen gewesen sein. Viele Patienten erhielten ab Krankheitsausbruch, aber noch vor der Untersuchung auf GBV-C, Transfusionen oder wurden transplantiert, so daß möglicherweise die GBV-C-Infektion erst durch die Transfusion oder die Transplantation, also nach Krankheitsausbruch, stattfand. Bisher konnte also zwar bei den oben genannten Erkrankungen vermehrt GBV-C nachgewiesen werden, aber nicht,

ob GBV-C-Infektionen ursächlich die Krankheiten ausgelöst haben oder daran beteiligt sein könnten.

Ob es bei einer GBV-C-Infektion zu einer Erhöhung der Leberenzymaktivitäten GPT, bzw. Alanin-Amino-Transferase (ALT) im Serum kommt, ist noch strittig. Während einige von einer Erhöhung der Leberenzymaktivität bei GBV-C-infizierten Patienten berichten [z.B. Karayiannis et al., 1997], konnte bei dem Vergleich der GBV-C-Infektionsrate von Blutspendern mit erhöhtem ALT-Serumspiegel und von Blutspendern mit normalem ALT-Serumspiegel kein großer Unterschied festgestellt werden [Mishiro et al., 1996; Seifried et al., 1998; Yoshikawa et al., 1996].

Bei chronischer HCV-Infektion scheint eine GBV-C-Koinfektion weder auf den Verlauf der chronischen Lebererkrankung noch auf die Histologie und auf das Ausmaß der Transaminasenerhöhung oder auf das Ansprechen auf eine antivirale Therapie einen Effekt zu haben. GBV-C ist zum Teil interferonsensibel, kann aber nach Absetzen der Therapie mit einer Rate von ca. 53 % wieder nachgewiesen werden. Außerdem besteht keine Korrelation zwischen Ansprechen von HCV und GBV-C auf Interferon [Rambusch et al., 1998].

Inzwischen mehren sich die Berichte, in denen kein Zusammenhang zwischen einer GBV-C-Infektion und Lebererkrankungen gesehen wird [Stark et al., 1999; Karayiannis et al., 1998; Silini et al., 1998; Woelfle et al., 1998; Thomas et al., 1997].

Selbst ein Hepatotropismus konnte für GBV-C nicht nachgewiesen werden [Petric et al., 1998; Pessoa et al., 1998]. Weiterhin wird berichtet, daß die Replikation von GBV-C vorwiegend nicht in der Leber stattfindet [Berg et al., 1999; Zampino et al., 1999]. Damit ist es fraglich, ob GBV-C sich in der Leber überhaupt schädigend auswirken kann.

1.6 Epidemiologie und Übertragung

Trotz des aufwendigen Nachweises von GBV-C (Nukleinsäureamplifikationstest, z.B. PCR) existieren relativ viele Untersuchungen zur Prävalenz von GBV-C. Die untersuchten Personengruppen sind jedoch oft sehr klein und willkürlich ausgewählt. Zum Beispiel erfolgte die Auswahl bei i.v.-Drogenabhängigen zum Teil noch zusätzlich nach ihrem Infektionsstatus. Außerdem sind die Nachweismethoden noch

nicht standardisiert. Je nachdem, ob nur auf GBV-C-RNA untersucht wurde oder auch E2-Antikörper nachgewiesen wurden, ergeben sich sehr unterschiedliche Angaben über die Prävalenz von GBV-C. Zusätzlich hängt die Effektivität der PCR bei der Untersuchung auf GBV-C-RNA von der Wahl der Primerpaare ab (siehe auch S. 8).

GBV-C wird wie auch HCV meist parenteral übertragen. Daher ist die Prävalenz für GBV-C bei Risikogruppen für eine parenterale Infektion (i.v.-Drogenabhängige, Empfänger von Blutprodukten wie Hämophilie- oder Dialysepatienten, Personen mit HIV-, HBV- oder HCV-Infektion) deutlich höher als bei der normalen Bevölkerung.

Blutspender

Die Angaben über die Prävalenz von GBV-C-RNA bei Blutspendern in Europa und den USA, bei denen keine HCV-Infektion nachgewiesen wurde, liegen zwischen 1 % und 5 % [Alter HJ 1996, Alter MJ et al., 1997, Feucht et al., 1997, Guilera et al., 1998, Heringlake, 1996, Prati et al., 1997, Schlüter et al., 1996, Zuckermann et al., 1995]. Wie diese 1-5 % der Blutspender die GBV-C-Infektion erworben hat, ist noch nicht ausreichend geklärt.

i.v.-Drogenabhängige

Angaben über positive GBV-C-RNA Befunde bei i.v. Drogenabhängigen reichen abhängig zum Beispiel von der geographischen Herkunft des Kollektivs oder von der Sensitivität des verwendeten Tests von 9 % [Lee et al., 1996] bis zu 49 % [Schreier et al., 1996]. Die meisten Angaben schwanken jedoch zwischen 16 % [Dawson et al., 1996a; Michel et al., 1996; Simons et al., 1996b] und knapp 40 % [Diamantis et al., 1997; Tacke et al., 1997a; RKI 1996].

HBV- oder HCV und GBV-C-Koinfektion

Durch die meist parenterale Übertragung von GBV-C sollten Personen mit HBV- oder HCV-Infektion, die ebenso übertragen werden, eine höhere Prävalenz von GBV-C aufweisen als andere.

Die Angaben über GBV-C-Koinfektionsraten bei HCV-positiven Patienten sind je nach Patientenkollektiv sehr unterschiedlich. Sie reichen von 6 % [Saiz et al., 1997] bis zu 93 % [Bukh et al., 1996]. In einer Übersichtsarbeit wurden aus insgesamt 66 Arbeiten eine Häufigkeit von Koinfektionen mit GBV-C und HCV von 17,5 % festgestellt (941 von 5388 Patienten). Nach Ausschluß besonderer Risikokollektive wie i.v.-Drogenabhängige, Dialysepatienten oder lebertransplantierte Patienten fand sich bei chronischer Hepatitis C eine GBV-C-Prävalenz von 13,8 %. Weiterhin

zeigten sich geographische Unterschiede mit Koinfektionsraten von 20,5 % in Europa im Vergleich zu 10,9 % in Japan [Rambusch et al., 1998].

Angaben über positive GBV-C-RNA Befunde bei Personen mit chronischer HBV-Infektion schwanken zwischen 9,7 % [Linnen et al., 1996] und 16,7 % [Heringlake et al., 1996].

Empfänger von Blutprodukten

Die Angaben über die Prävalenz von GBV-C-RNA bei mehrfach transfundierten Patienten reichen von 11 % [Alter HJ et al., 1996] bis 33 % [Mosley et al., 1996], bei Hämophiliepatienten von 6 % [Tagariello et al., 1996] bis 35 % [Feucht et al., 1997].

GBV-C-Infektion bei Dialysepatienten

Da auch Dialysepatienten vor Einführung der Erythropoietin-Therapie wegen einer renalen Anämie regelmäßig Transfusionen erhielten, hatten sie ein erhöhtes Infektionsrisiko für parenteral übertragene Viren und damit auch für GBV-C. Die Gefahr der Übertragung von parenteral übertragbare Viren wie HBV, HCV und HDV durch Transfusionen ist seit der regelmäßigen Untersuchung der Blutspender auf HBV (HB_sAg) und HCV stark zurückgegangen. Da aber auf GBV-C nicht untersucht wird, ist weiterhin ein erhöhtes Risiko für die Übertragung von GBV-C durch Transfusionen vorhanden.

Die Angaben über die Prävalenz von GBV-C-RNA schwanken von 3 % [Masuko et al., 1996] bis 54 % [Wang et al., 1997].

Sheng und Mitarbeiter [1998] stellten bei der Untersuchung auf GBV-C-E2-Antikörper, als Hinweis auf eine zurückliegende Infektion, eine Prävalenz von 14,2 % fest.

In der Studie von Klingelhöfer [Dissertation 1998] wurden 390 Dialysepatienten auf GBV-C-RNA und GBV-C-E2-Antikörper untersucht. Da nur 3 % der Patienten eine GBV-C-Virämie mit gleichzeitigem Vorhandensein von GBV-C-E2-Antikörpern aufwiesen, wurde der Nachweis von Antikörpern wie in anderen Studien [Pilot-Matias et al., 1996c; Tacke et al., 1997; Hassoba et al., 1997] als eine überstandene GBV-C-Infektion gewertet. Daher werden alle Patienten mit GBV-C-Infektionsmarkern (GBV-C-RNA positiv und/oder GBV-C-Anti-E2 positiv) als GBV-C Positive bezeichnet. Die Studie hat gezeigt, daß GBV-C-Infektionen häufiger als HCV-Infektionen vorkommen. Auch die gehäuft vorkommende Koinfektion von GBV-C und HCV konnte bestätigt werden. Aussagen über die Prävalenz von GBV-C bei

Dialysepatienten im Gesamtkollektiv waren schwierig, da die Seren nach bestimmten Kriterien ausgewählt worden waren. Bei der Frage nach dem Übertragungsweg konnte als wichtigster Faktor die Bluttransfusion ermittelt werden. Transfundierte Patienten waren mit 49,3 % deutlich häufiger GBV-C positiv als nicht transfundierte mit 22,9 %. Aber auch diese nicht transfundierten Patienten haben mit 22,9 % eine deutlich höhere Prävalenz als die Normalbevölkerung mit 1-5 %. Damit stellt sich die Frage nach dem Übertragungsweg. Eine Möglichkeit wäre die nosokomiale Infektion während der Dialysetherapie, da tatsächlich die GBV-C-Infektionsrate mit zunehmender Expositionsdauer, d.h. Dialysedauer, ansteigt. Damit könnte der Nachweis von GBV-C möglicherweise als Hinweis für nosokomiale Infektionen gelten.

Weitere Übertragungswege

Auch eine sexuelle Übertragung ist wahrscheinlich [Ibamez et al., 1998]. Bei einem Ehepaar mit positivem GBV-C-RNA Befund war die RNA-Sequenz beider Isolate identisch [Sarrazin et al., 1997]. Auch die erhöhte Prävalenz bei Prostituierten von 18 % [Scallan et al., 1998], 21 % [Wu et al., 1997] und 25 % [Sawayama et al., 1999] und bei männlichen Homosexuellen von 31 % [Scallan et al., 1998] spricht für die Möglichkeit einer sexuellen Übertragung.

Außerdem wurde auch GBV-C-RNA bei 15 von 17 schottischen Blutspendern mit positivem GBV-C-RNA-Befund im Speichel nachgewiesen [Blair et al., 1998].

Sehr wahrscheinlich gibt es auch eine vertikale Übertragung von GBV-C. Viazov und Mitarbeiter konnten bei 10 Kindern von 18 GBV-C-RNA positiven Müttern GBV-C-RNA nachweisen [Viazov et al., 1997b]. Nach einer anderen Studie waren 21 Kinder von 34 GBV-C-RNA positiven Müttern ebenfalls GBV-C-RNA positiv [Zanetti et al., 1998].

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Mit dieser Studie soll der Infektionsverlauf von GBV-C untersucht werden. Dazu haben wir Dialysepatienten mit bekanntem GBV-C-Status mit einem Untersuchungsabstand von 2 ½ Jahren erneut auf GBV-C-RNA und GBV-C-E2-Antikörper untersucht. Unsere Nachuntersuchung gründet sich auf eine Studie, bei der Seren von 390 Dialysepatienten auf GBV-C-RNA und GBV-C-E2-Antikörper untersucht worden waren [Dissertation I. Klingelhöfer, 1998]. Wir versuchten, von möglichst allen 390 Patienten erneut Proben zu beschaffen und auf GBV-C zu untersuchen.

So konnten wir anhand der Patienten, die vorher Virusträger waren, feststellen, ob eine bestehende GBV-C-Infektion chronisch bleibt oder ob sie spontan aufhören kann.

Kommt es mit der Antikörperbildung zum Verschwinden der GBV-C-Virämie oder kommen Antikörper und Virus gemeinsam längere Zeit vor?

Die Ergebnisse der Nachuntersuchung bei Patienten mit positiven GBV-C-E2-Befunden lieferten uns Anhaltspunkte, wie lange die Antikörper persistieren.

Weiterhin stellt sich die Frage nach Neuinfektionen. Haben Dialysepatienten, die vorher keine GBV-C-Infektionsmarker hatten, noch immer ein höheres Infektionsrisiko für parenteral übertragbare Viren als die Normalbevölkerung?

Letztendlich suchten wir nach Faktoren, die einen Einfluß auf Veränderungen im GBV-C-Infektionsstatus haben könnten. Dazu verglichen wir Merkmale wie Alter, Geschlecht, Transfusionsstatus, Dialysedauer und HCV-Infektionsstatus bei Dialysepatienten, bei denen sich der GBV-C-Infektionsstatus verändert hat: 1. bei ehemals GBV-C-infizierten Patienten, die serokonvertiert sind und die nicht serokonvertiert sind; 2. bei Patienten mit GBV-C-E2-Antikörpern, die weiterhin Antikörper hatten und bei denen keine Antikörper mehr nachweisbar waren; 3. bei Patienten, die sich neu infiziert haben und solche, die weiterhin keine GBV-C-Infektionsmarker hatten.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Zusammensetzung und Herkunft des Kollektivs der Vorstudie

Bei der Voruntersuchung von I. Klingelhöfer [Dissertation 1998] wurden Seren von 390 Patienten aus 50 Dialysezentren (siehe S.63-64) in ganz Deutschland auf GBV-C-RNA und -E2-Antikörper untersucht. Diese Seren stammen aus einem Gesamtkollektiv von Seren, welche im Rahmen einer infektionsserologischen Studie (Wankow/Lendeckel/Caspari) von Dezember 1993 bis Oktober 1994 im Institut für Medizinische Virologie Gießen von 2.307 Patienten gesammelt und bei -20 °C eingefroren wurden. Sie wurden auf HTLV I/II-Antikörper, Anti-HCV, HCV-RNA und Hantavirus-Antikörper untersucht.

Die Auswahl der 390 Seren erfolgte unter Berücksichtigung von HCV-Status, der Transfusionshäufigkeit, der Dialysedauer, des Geschlechts und des Alters der Patienten. Da laut Literaturangaben gehäuft Koinfektionen mit HCV und GBV-C zu erwarten sind, wurden zuerst alle Patienten, die entweder HCV-PCR oder Anti-HCV positiv, bzw. fraglich positiv waren, ausgewählt.

Weiterhin wurde die Transfusionshäufigkeit berücksichtigt, um den Zusammenhang von GBV-C-Infektionen mit Bluttransfusionen zeigen zu können.

Schließlich wurde versucht, eine gleichmäßige Verteilung in bezug auf die Altersklassen und das Geschlecht zu erreichen.

2.1.2 GBV-C-RNA und GBV-C-E2-Antikörper-Befunde der Vorstudie

Bei der Untersuchung von Klingelhöfer auf GBV-C-RNA waren 73 (18,7 %) Seren der 390 untersuchten Patienten positiv und 317 (81,3 %) negativ.

Entscheidend für die Nachuntersuchung war, daß die Seren bei der Voruntersuchung mit verschiedenen Primerpaaren getestet wurden. Dabei stellte sich heraus, daß nicht alle Seren mit GBV-C-RNA mit allen Primerpaaren positiv reagierten.

Tab. 2.1: Positive Ergebnisse mit vier verschiedenen Primerpaaren bei den GBV-C-RNA positiven Seren der Vorstudie

Anzahl der GBV-C-RNA Positiven	5`NCR 1	5`NCR 2	NS5 1	NS5 2
46	+	+	+	+
6	–	+	+	+
6	+	+	+	–
2	+	+	–	–
2	+	–	–	–
10	–	+	–	–
1	–	–	–	+
73	56	70	58	53

5`NCR 1 = Primerpaar aus der 5`NCR Region von GBV-C von Boehringer Mannheim [Schlüter et al.,1996]; 5`NCR 2 = weiterentwickeltes Primerpaar aus der 5`NCR Region von GBV-C von Boehringer Mannheim [Schlüter et al., 1996]; NS5 1= Primerpaar aus der NS5 Region von GBV-C von Boehringer Mannheim [Schlüter et al., 1996]; NS5 2 = Primerpaar aus der NS5 Region von Viazow [Viazow et al., 1996]

Mit dem weiterentwickelten Primerpaar aus der 5`NCR-Region von Boehringer Mannheim (5`NCR 2) wurden 96 % der positiven Proben erfaßt. Daher wurde dieses Primerpaar bei der Nachuntersuchung eingesetzt. Erst bei negativem Befund in der Nachuntersuchung mit dem Primer 5`NCR 2 von Proben, die bei der Voruntersuchung mit anderen Primern positiv waren, wurden die anderen Primer eingesetzt. Da der einzige Patient, dessen positiver GBV-C-RNA Befund aus der Vorstudie ausschließlich mit dem Primer NS5 2 erzielt wurde, inzwischen verstorben war, konnte bei den Nachuntersuchungen auf diesen Primer verzichtet werden.

Bei der Untersuchung von Klingelhöfer auf Antikörper gegen das E2-Protein von GBV-C waren 106 (27,2 %) Seren positiv, 5 (1,3 %) fraglich positiv und 279 (71,5 %) negativ.

Nach den Ergebnissen aus der Vorstudie von GBV-C-RNA und GBV-C-E2-Antikörpern in Kombination teilten wir zur besseren Übersicht die Patienten ein:

Gruppe I: 61 Seren waren GBV-C-RNA positiv und GBV-C-Anti-E2 negativ

Gruppe II: 12 Seren waren RNA und GBV-C-Anti-E2 positiv

Gruppe III: 94 Seren waren RNA negativ und GBV-C-Anti-E2 positiv

Gruppe IV: 218 Seren waren RNA und GBV-C-Anti-E2 negativ

2.1.3 Beschaffung der Proben für die Nachuntersuchung

Die leitenden Ärzte der Zentren wurden angeschrieben mit der Bitte, uns Probenmaterial (Serum) von den Patienten zuzuschicken, die 1996 von Klingelhöfer auf GBV-C untersucht wurden.

Da von den Patienten aus Gründen des Datenschutzes nur die Initialen sowie deren Geburtsdatum und Geschlecht bekannt waren, war es nach 2 ½ Jahren oft schwierig, die Patienten wieder ausfindig zu machen. Durch Umzug, Transplantation oder Tod wurden viele Patienten nicht mehr in der Kartei geführt. Bei Patienten mit neuem Wohnsitz und bekannter Adresse des neuen Dialysezentrums wurde auch dieses neue Zentrum angeschrieben und um Mitarbeit gebeten. Sofern die Patienten ausfindig gemacht wurden, erklärten sich alle behandelnden Ärzte bereit, für unsere Studie Serum, bzw. Blut der Patienten zur Verfügung zu stellen.

Dazu wurde den Patienten vom Personal der Dialysestation Blut abgenommen. In den Dialysestationen *der näheren Umgebung* wurde das Nativblut sofort gekühlt und innerhalb von max. 6 Stunden von mir abgeholt und gekühlt transportiert. Nach der Zentrifugation wurde das Serum unverzüglich aliquotiert und eingefroren.

In den weiter entfernten Dialysestationen wurde das Blut vom Personal zentrifugiert. Wenn mehrere Patienten an unserer Studie teilnahmen und in verschiedenen Schichten dialysiert wurden, wurde das Serum bei mind. -18 °C eingefroren. Waren so alle Seren gesammelt, wurden sie, auf Eis, Tiefkühlelementen oder Trockeneis in Styropor verpackt, mit „TNT-Express GmbH“ (Lilienthalstr.1, 34123 Kassel) über Nacht in unser Institut gebracht. Waren alle Patienten in einem Zentrum am gleichen Tag dialysiert worden, wurden die Seren nicht eingefroren, sondern nur gekühlt und über Nacht nach Gießen geschickt.

Die Seren wurden ggf. aufgetaut, nochmals alle zentrifugiert und das Serum aliquotiert und eingefroren. So sollte sichergestellt werden, daß die RNA-Konzentration so gut wie möglich erhalten blieb.

2.2 Nachweis von GBV-C -RNA

Heutzutage ist es möglich, mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR, 1985 von K. Mullis entwickelt) kleinste Mengen an Desoxyribonukleinsäure-(DNA-) Abschnitten zu vervielfachen und damit nachzuweisen. Um Virus-RNA nachzuweisen, muß diese erst aus dem Serum isoliert werden (**Extraktion**), damit anschließend mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) die RNA in eine cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden kann (**Reverse Transkription**). Nun kann mittels der PCR die Zielsequenz der cDNA exponentiell vervielfältigt werden (**Amplifikation**), so daß diese nachgewiesen werden kann (**Detektion**).

2.2.1 Vermeiden von Kontaminationen

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der PCR, mit der im Extremfall einzelne Virusgenome nachgewiesen werden können, sind eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen auch schon vor der eigentlichen PCR nötig, um Kontaminationen zu vermeiden.. Es wurden nur Reagentien verwendet, die vom Hersteller ausdrücklich als PCR-geeignet ausgezeichnet waren. Es wurden verschiedene Arbeitsbereiche benutzt, in denen jeweils eigene Arbeitsmittel, wie Kittel, Einmalhandschuhe, Pipetten und -spitzen, Zentrifugen, Schüttler und Eppendorfgefäße zur Verfügung standen. Die Reagentien wie Puffer und dNTP's (Desoxynukleosidtriphosphate) wurden auf Vorrat zubereitet und in kleinen Portionen gelagert, um Verunreinigungen der Vorratslösungen vorzubeugen.

- Arbeitsbereich I:** Aufbewahrung, Aliquotierung und Zubereitung der Reagentien (unter dem Abzug), kein Kontakt mit der nachzuweisenden RNA oder der Amplifikate (template-frei)
- Arbeitsbereich II:** Extraktion, reverse Transkription, Amplifikation, keine offene Handhabung von Amplifikaten
- Arbeitsbereich III:** Aufbewahrung und Detektion der Amplifikate (größte Gefahr: Kontamination durch Aerosole)

2.2.2 Kontrollen

Funktionskontrolle:

Zur Kontrolle auf Funktionsfähigkeit des Tests (Vollständigkeit der Testmischungen, Degradierung einzelner Komponenten und Richtigkeit der Testdurchführung) wurde bei jedem Testdurchlauf ein GBV-C-positives Kontrollserum von Boehringer Mannheim untersucht. Zusätzlich wurden bei der Detektion als Funktionskontrolle zwei Digoxigenin-markierte PCR-Produkte eingesetzt.

Sensitivität:

Um die Sensitivität der PCR zu testen, wurde GBV-C-RNA aus einem stark GBV-C-positivem Kontrollserum von Boehringer Mannheim isoliert, revers transkribiert und mit dieser cDNA eine Verdünnungsreihe erstellt. Durch Zugabe von RNase freiem Wasser ergab sich eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 4 von V1 (Verdünnung: 1:4) bis V6 (Verdünnung 1:4096), bei den ersten beiden Durchgängen bis V7 (Verdünnung: 1:16384), die bei jedem Durchgang ab der Amplifikation eingesetzt wurden.

Kontaminationen:

Bei jedem Testdurchlauf wurde ein GBV-C negatives Kontrollserum eingesetzt, um Verunreinigungen von Reagentien mit der Ziel-DNA und damit falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Außerdem wurde anhand der Extinktion des negativen Kontrollserums der Cut-off berechnet.

2.2.3 Extraktion

Testprinzip:

Ziel der Extraktion ist es, möglichst reine RNA in hoher Konzentration zu erhalten. Wir verwendeten zur Extraktion den QIAamp Viral RNA Extraktionskit® der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland).

Zu dem Serum wird ein Viruslyse-Puffer gegeben, der die RNA von der Virushülle befreien soll.

In Gegenwart von chaotropen Salzen (im Viruslyse-Puffer enthalten) binden Nukleinsäuren spezifisch an Silica-Oberflächen. Bei diesem Test wird das Reaktionsgemisch in sogenannte Spin Columns überführt, die eine Silica-gel-beschichtete Membran enthalten, an der die virale RNA anhaften kann. Danach sollen mit zwei Waschschritten möglichst alle Verunreinigungen beseitigt werden, die die reverse Transkription stören könnten.

Mit heißem Wasser kann schließlich über 90 % von der RNA wieder von den Spin Columns gelöst werden. Damit erreicht man eine Aufkonzentrierung der RNA um mindestens das 2 ½-fache.

Um zu verhindern, daß die ubiquitär vorkommenden RNasen die RNA abbauen, wurde RNase-freies Wasser verwendet. Dazu wurde destilliertes Wasser mit DEPC behandelt (siehe S. 21).

Material:

	Firma	Bestellnummer
QIAamp Viral RNA Extraktionskit® ■ Virus Lysis Puffer ■ carrier RNA (poly A), gefriergetrocknet ■ Waschpuffer ■ QIAamp Spin Columns ■ Collection Tubes	QIAGEN (Hilden)	29506
Ethanol (100 %)	Riedel-de Haen (Seelze)	32205 on-No. 1170
RNase freies Wasser: 125 µl (Verhältnis 1:1000) DEPC mit 125 ml Aqua Bid. mischen, über Nacht bei 37 °C inkubiert, dann 2 x 20 Minuten autoklaviert		
Eppendorfgefäße (1,5 ml), Pipetten, sterile, gestopfte Pipettenspitzen, Einmal- handschuhe, Mikrozentrifuge, Thermocycler, Schüttler		

Durchführung:

Nachdem 150 µl Serum aufgetaut und nochmals zentrifugiert worden waren, wurden davon 140 µl mit 560 µl Virus Lysis Puffer vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Diese Lösung wurde in zwei Schritten mit je 630 µl in die Spin Columns überführt (auf Eis), zentrifugiert und die abgeflossene Lösung im Sammelröhrchen (Collection Tube) verworfen.

Danach wurde zweimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert.

Mit Zugabe von je 50 µl, 80 °C heißem, RNase freiem Wasser wurden die Spin Columns fünf Minuten bei 80 °C inkubiert, zentrifugiert und damit die RNA von der Membran des Spin Columns gelöst. Die Proben wurden auf Eis zwischengelagert und sofort die reverse Transkription vorbereitet.

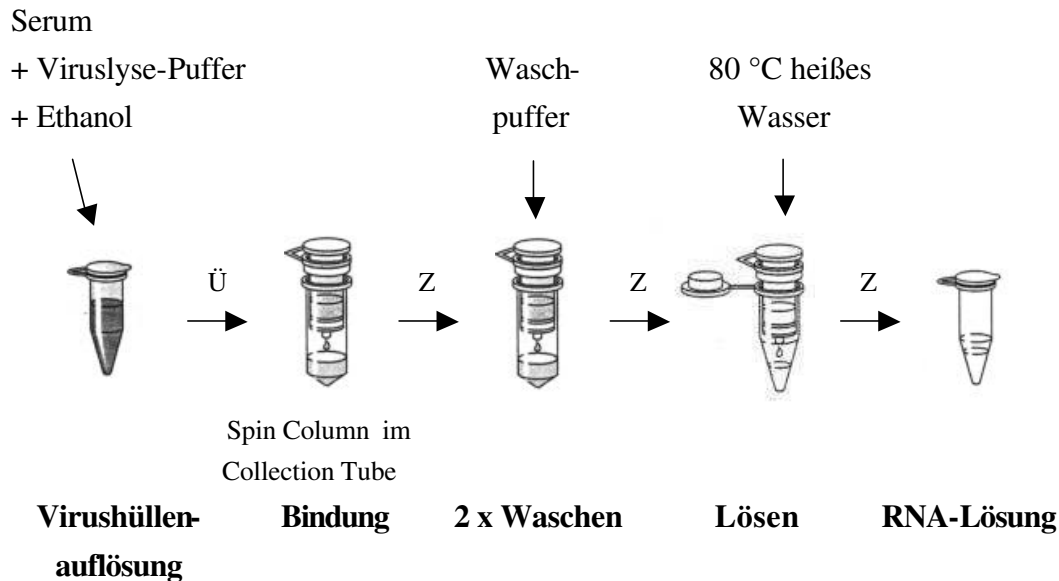


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der RNA-Extraktion

QIAamp Viral RNA Handbook 06/96 S.9, modifiziert

Ü = Überführen der Lösung in die Spin Columns; Z = Zentrifugation

2.2.4 Reverse Transkription

Testprinzip:

Da bei der Amplifikation die *Taq*-DNA-Polymerase nur DNA-Abschnitte vervielfältigt, muß die RNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängige DNA-Polymerase, in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Dazu benötigt man Primer, die an die RNA hybridisiert werden und anschließend von der Reversen Transkriptase mit dNTP's entlang der Matrize in 5'→3'-Richtung zu einer cDNA verlängert werden. Als Primer können Mischungen kurzer DNA-Hexanukleotide aller theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen (sogenannte Random Primer) oder spezifische Oligonukleotide eingesetzt werden. Wir verwendeten Random Primer (nach Untersuchungsergebnissen von Klingelhöfer effektiver) und als Reverse Transkriptase eine Enzymvariante der Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV)-Reversen Transkriptase, die im Gegensatz zu anderen Reversen Transkriptasen die RNA während der cDNA- Synthese nicht abbaut.

Sowohl für die reverse Transkription als auch für die PCR ist die Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen erforderlich.

Zur Verhinderung des RNA-Abbaus werden hier außer Verwendung von RNase-freiem Wasser noch RNase-Inhibitoren zugesetzt.

Schließlich muß das Gemisch mit Mineralöl überschichtet werden, damit es während der Inkubation bei 42 und 94 °C nicht zu einer Verdunstung kommt.

Material:

	Firma	Bestellnummer
Superscript™ <ul style="list-style-type: none"> ■ Reverse Transkriptase: rekombinante M-MuLV-RT mit 200 U/μl ■ 5-fach konz. RT-Puffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$) ■ DTT 0,1 M 	Gibco BRL (Eggenstein)	18053-017
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia (Freiburg)	27-2035-01
Hexanucleotid Mix	Boehringer Mannheim	1277081
RNase-Inhibitor	Pharmacia (Freiburg)	27-0815-01
RNase freies Wasser, Mineralöl, Eppendorfgefäße, Einmalhandschuhe, gestopfte Pipettenspitzen, Schüttler, Mikrozentrifuge, Thermocycler		

Durchführung:

Unter einem Abzug wurden auf Eis folgende Reagentien zum Master Mix, ein Gemisch aller Reagentien für die gesamte Probenanzahl + 1 (Pipettierreserve), angesetzt:

Reagentien für Master Mix	Endkonzentration/ Reaktion	Volumen/ Reaktion	x (Probenanzahl + 1)
PCR Nucleotid Mix	200µM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,4 µl	
Hexanucleotid Mix	50 nM	1,0 µl	
RNase Inhibitor	38,9 U	1,0 µl	
RNase freies Wasser		0,6 µl	
M-MuLV-Reverse Transkriptase	200 U	1,0 µl	
5 x RT Puffer		4,0 µl	
DTT	10 mM	2,0 µl	
gesamt		10,0 µl	

Es wurde sorgfältig gemischt und dann je 10 µl des Master Mixes in Eppendorfgefäße gegeben. Dazu wurden je 10 µl der RNA-Lösung pipettiert, gemischt, zentrifugiert und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Reaktionsvolumen:

Master Mix	10 µl
RNA-Lösung	10 µl
insgesamt	20 µl

Schließlich wurden die Proben inkubiert:

- 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 30 Minuten bei 42 °C
- 5 Minuten bei 94 °C (zur Denaturierung der Enzyme, die die Amplifikationsreaktion stören könnten)
- auf 4 °C abgekühlt und innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet oder
- bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Amplifikation

Testprinzip:

Ziel der PCR ist es, bestimmte Zielsequenzen vorhandener DNA so stark zu vervielfältigen, daß sie mit einfachen Verfahren nachweisbar werden. In mehreren sich wiederholenden Zyklen wird doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten (**Denaturierung**). Dadurch können sich für die Zielsequenz spezifische, vorgefertigte Oligonukleotide (Primer) an den Einzelstrang anlagern (**Annealing**). Im dritten Schritt ergänzt die Polymerase, bei den Primern beginnend, die einzelsträngige DNA mit den ebenfalls zugegebenen (markierten) Nukleotiden zu einem Doppelstrang (**Elongation**). Damit kann der nächste Zyklus beginnen.

- Denaturierung:

Zuerst müssen DNA-Doppelstränge durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge zerlegt werden.

Temperaturbereich: 93-100 °C.

- Annealing:

Für die Amplifikation benötigt man zwei Oligonukleotidprimer (kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle), die aus dem Randbereich der zu amplifizierenden Sequenz (Zielsequenz) stammen und komplementär zu jeweils einem der nachzuweisenden DNA-Stränge sind. Sie flankieren in der Regel einen Abschnitt von 150 bis 400 Basen.

Nach Abkühlung lagern sich diese Primer je an die beiden Einzelstränge an und bilden kurze Doppelstrangregionen.

Temperaturbereich: 37-65 °C (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer).

- Elongation:

Die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen die Primer an ihrem 3'OH-Ende entlang der Matrize in 3'→5'Richtung anhand von dNTP's, so daß neue DNA-Stränge mit komplementärer Sequenz entstehen.

Hier wird für die verwendete Version der PCR dUTP verwendet, das mit Digoxigenin konjugiert ist.

Temperaturoptimum: 72 °C.

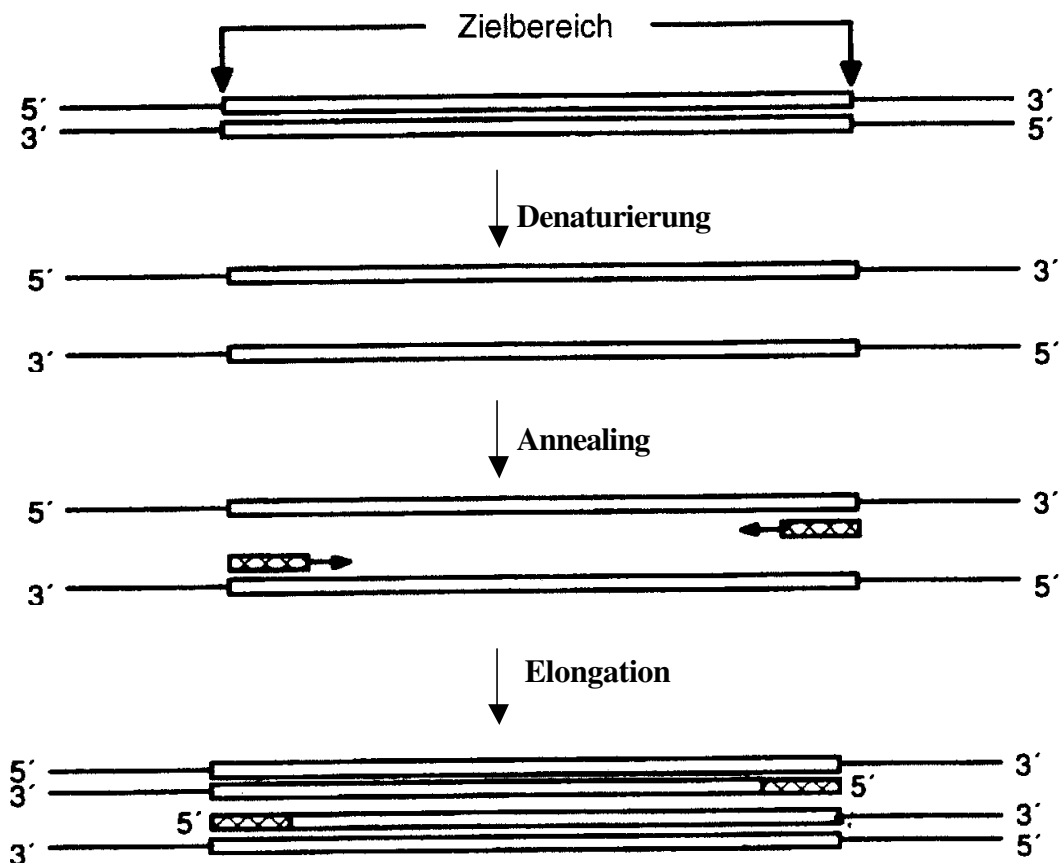
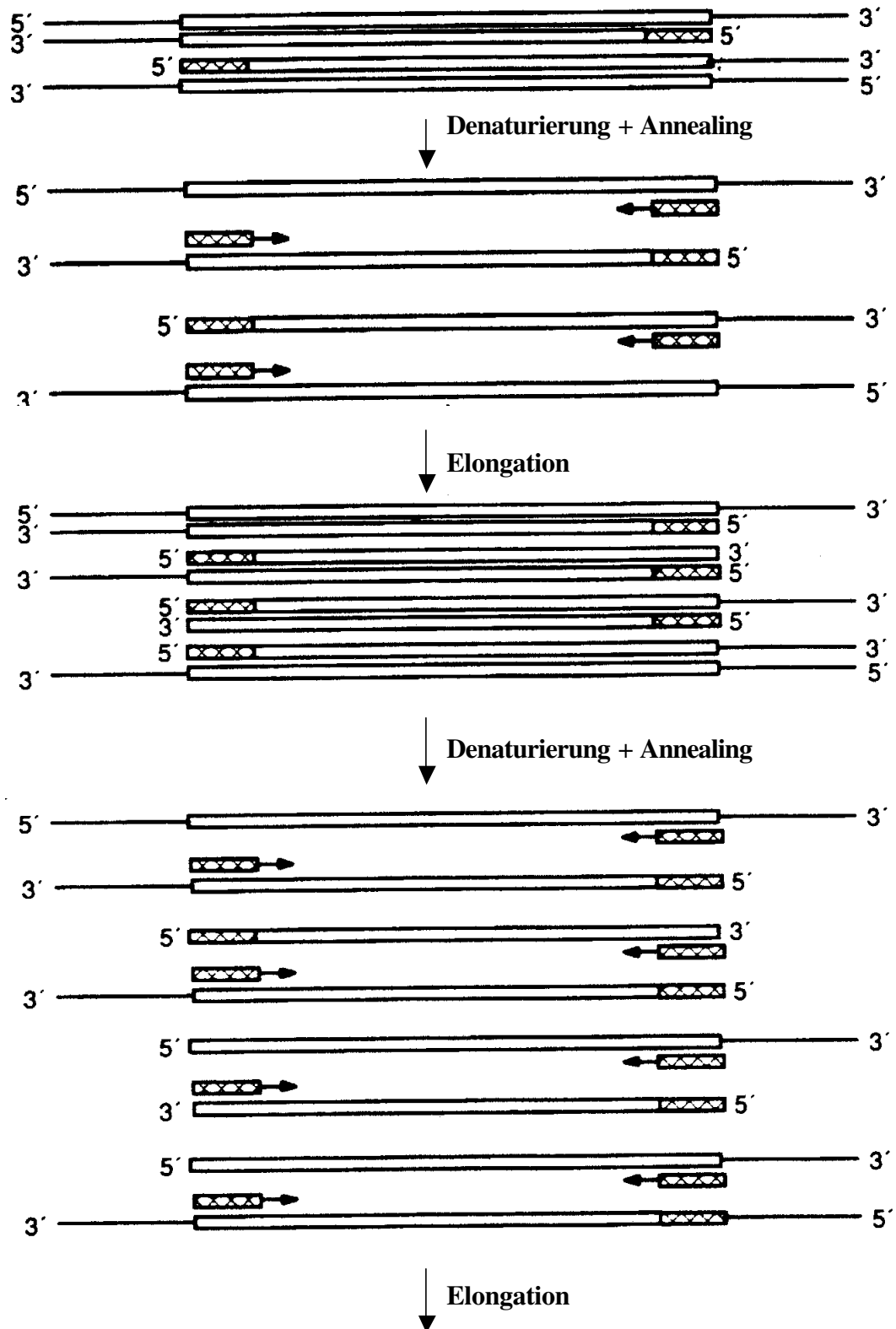


Abb. 2.2: Denaturierung, Annealing und Elongation der PCR,

Newton CR, Graham A (1994) PCR, Spektrum Akademischer Verlag, S. 23, modifiziert

Am Ende dieser Reaktion liegen die DNA-Moleküle wieder als Doppelstränge vor, so daß bei jedem neuem Zyklus diese durch Hitze erst wieder aufgespalten werden müssen.

Da auch die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize dienen, verdoppeln sich in jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Kopien. Der an der ursprünglichen Matrize verlängerte DNA-Strang hat noch keine definierte Länge, da die Polymerisation erst irgendwann von alleine anhält oder durch den nächsten Zyklus gestoppt wird. So entstehen hier an der ursprünglichen Matrize linear bei jedem Zyklus „lange“ Produkte, während der DNA-Strang mit der Zielsequenz exponentiell vervielfältigt wird.



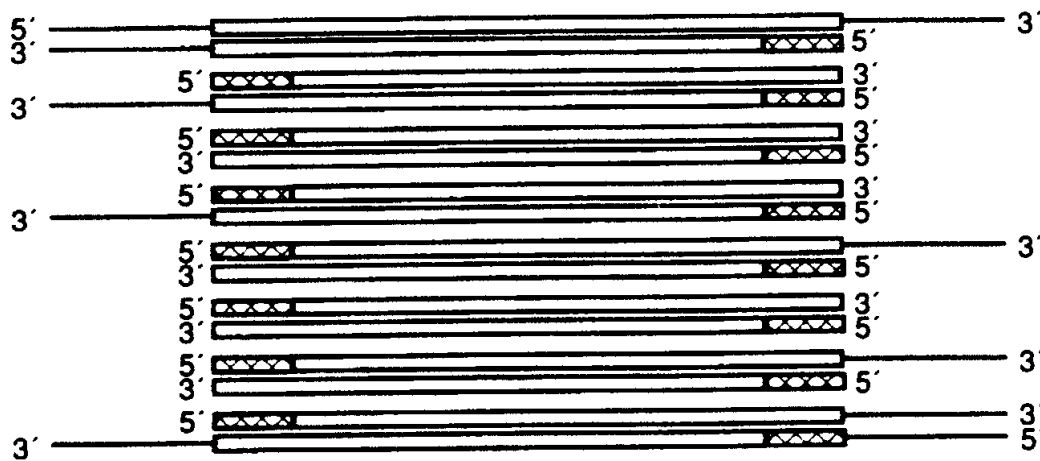


Abb. 2.3: Amplifizierung der kurzen Zielsequenz und der langen Produkte

Newton CR, Graham A (1994) PCR, Spektrum Akademischer Verlag, S. 23, modifiziert

Entscheidend für die Effektivität und Spezifität der PCR sind außer der Qualität der DNA-Matrize und der Konstruktion der Primer vor allem die Reaktionsbedingungen. Dabei spielen die Konzentrationen der einzelnen Reagentien, insbesondere der Magnesiumionen, aber auch das PCR-Temperaturprofil eine Rolle.

Begrenzt wird die Reaktion meist von der Enzymmenge und der abnehmenden Aktivität des Enzyms, sowie der Menge an Primern und Nukleotiden. Aber auch Hybridisierungen unter den DNA-Strängen konkurrieren mit der Primeranlagerung und mindern die Effektivität.

Material:

HGV Primer and Capture Probe Set, Firma: Boehringer Mannheim,
Bestellnummer: 1 782 720

Primer NS5 1: aus der NS5 Region von GBV-C [Schlüter et al., 1996]

- NS5 forward Primer: 25-mer, Position NS5a 77-101
5`Ende-CTC TTT GTG GTA GTA GCC GAG AGA T-3`E.
- NS5 reverse Primer: 24-mer, Position NS5a 211-188
5`Ende-CGA ATG AGT CAG AGG ACG GGG TAT-3`Ende

Primer 5`NCR 1: aus der 5`NCR Region von GBV-C [Schlüter et al., 1996]

- 5`NCR forward Primer: 20-mer, Position 101-120
5`Ende-CGG CCA AAA GGT GGT GGA TG-3`Ende
- 5`NCR reverse Primer: 19-mer, Position 285-267
5`Ende-CGA CGA GCC TGA CGT CGG G-3`Ende

Primer 5`NCR 2: aus der 5`NCR Region von GBV-C [Schlüter et al., 1996]
Sequenz nicht bekannt

ExpandTM High Fidelity PCR System ®: Firma: Boehringer Mannheim
Bestellnummer: 1 732 650

- DNA Desoxynucleotidyltransferase (Taq DNA Polymerase) Konz./Reaktion:
2,6 U, in: 20 mM Tris HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT),
0,1 mM EDTA, 0,5 % Tween®20, 0,5 % Nonidet® P40, 50 % Glycerol;
- Expand HF Puffer 10x konz. mit 15 mM MgCl₂

PCR DIG Labeling Mix: Firma: Boehringer Mannheim
Bestellnummer: 1 585 550

Nucleotid-Mix (dUTP ist mit Digoxigenin markiert): je 2 mM dATP, dCTP, dGTP,
1,9 mM dTTP, 0,1 mM Digoxigenin-11-dUTP in Wasser, pH 7,0

RNase freies Wasser, Einmalhandschuhe, PCR-tubes, gestopfte Pipettenspitzen,
Pipetten, Schüttler, Mikrozentrifuge, Thermocycler PE 9600 der Firma Perkin Elmer

Durchführung:

Folgende Reagentien wurden unter Abzug auf Eis gemischt:

Reagentien des Master Mix 1	Endkonzentration/ Reaktion	Volumen/ Reaktion	x (Probenanzahl + 1)
DIG Labeling Mix	je 200 μ M von ATP, dCTP, dGTP; 190 μ M dTTP, 10 μ M DIG-11-dUTP	5,0 μ l	
Primer-mix 5' NCR2	je 5 μ M	4,0 μ l	
RNase freies Wasser		11,0 μ l	
gesamt		20,0 μ l	

Reagentien des Master Mix 2	Endkonzentration/ Reaktion	Volumen/ Reaktion	x (Probenanzahl + 1)
10 x Expand HF Puffer	10x	5,0 μ l	
Expand TM High Fidelity PCR System	2,6 U	0,75 μ l	
RNase freies Wasser		14,25 μ l	
gesamt		20,0 μ l	

Weiterhin wurden auf Eis zu 20 μ l des Master Mixes 1 in einem PCR- tube 10 μ l cDNA gegeben und mit 20 μ l des Master Mixes 2 vermischt.

Reaktionsvolumen:

Master Mix 1	20 μ l
Master Mix 2	20 μ l
cDNA	10 μ l
insgesamt	50 μ l

Anschließend wurden die Proben sofort in den Thermocycler PE (PERKIN ELMER) 9600 gegeben und die Amplifikation mit folgendem Programm gestartet:

		10 sec. bei 85 °C	Hauptprogramm
		2 min. bei 94 °C	
45x	Denaturation	30 sec. bei 94 °C	
	Annealing	30 sec. bei 55 °C	
	Elongation	30 sec. bei 72 °C	
		7 min. bei 72 °C	
		Kühlung bei 5 °C	
Gesamtdauer ca. 2 ½ Stunden			

2.2.6 Detektion

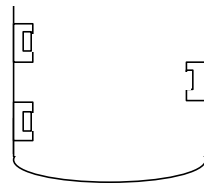
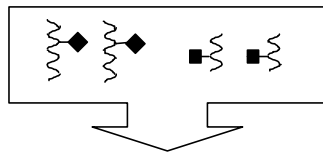
Testprinzip:

Die amplifizierten DNA-Moleküle werden durch eine Denaturierungslösung in Einzelstränge getrennt. Diese können sich dann an die Biotin-markierte Capture Probe (Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz zu einer bestimmten Position der amplifizierten DNA-Molekülen) anlagern, die sich wiederum an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte fest bindet.

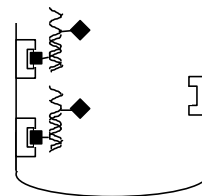
Alle anderen Substanzen/Moleküle werden durch den folgenden Waschschrift entfernt. Da im Amplifikat dUTP mit Digoxigenin markiert ist, kann sich nun der im Konjugat enthaltene Anti-Digoxigenin-Antikörper anlagern. Dieser ist mit Peroxidase (POD) markiert.

Nachdem nicht gebundenes Konjugat wieder durch Waschen beseitigt wurde, wird die Mikrotiterplatte mit einer Substrat-Chromogenlösung (ABTS®/H₂O₂) beschichtet. Nun kann die Peroxidase das Azino-di-diammonium Salz (ABTS®) in ein farbiges Produkt umwandeln, dessen Extinktion gemessen werden kann. Je mehr amplifizierte DNA-Moleküle und damit farbiges Produkt vorhanden ist, um so größer die Extinktion.

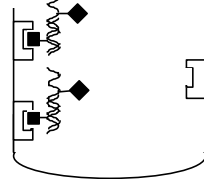
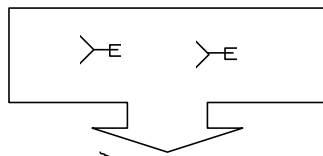
Amplifikat + Hybridisierungslösung



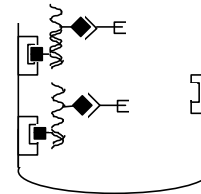
Waschen



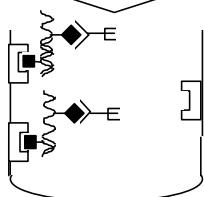
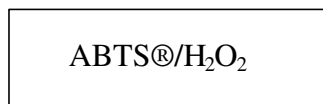
Konjugatlösung



Waschen



Substrat-Chromogenlösung



Farbentwicklung

Messung/
Auswertung

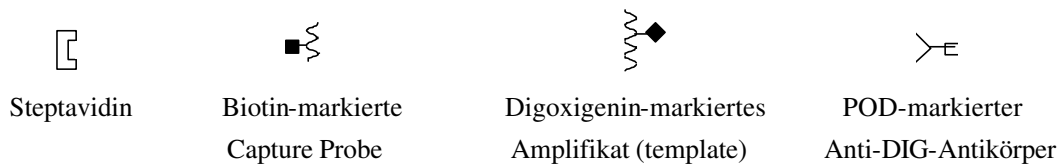


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Detektion

Material:

PCR ELISA®, Firma: Boehringer Mannheim,

Bestellnummer: 1636111

Detektionskit für GBV-C-PCR-Produkte, die Digoxigenin-markiertes dUTP enthalten:

- Denaturierungslösung: (Puffer: 50mmol/l NaOH)
- Hybridisierungslösung: Puffer (Phosphat, pH 6,5) vermischt im Verhältnis 100:1 mit der biotinylierten Capture Probe (75 ng/l)
- Konjugatlösung: Puffer (Tris HCl, pH 7,5) vermischt im Verhältnis 100:1 mit Anti-Digoxigenin-Peroxidase (polyklonal, POD \geq 1 U/ml in 1,5 ml aqua bid. gelöst)
- Substratlösung: Puffer (100mmol/l Phosphat/ Citrat, pH 4,4; 3,2 mmol/l H₂O₂) mit ABTS®
- Funktionskontrolle (Digoxigenin-markierte PCR-Produkte)
- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten

HGV Primer and Capture Probe Set, Firma: Boehringer Mannheim,

Bestellnummer: 1782720

- NS5 1 capture Probe: 21-mer, Position NS5a152-172
5`Ende-Biotin-GTT ACT GAG AGC AGC TCA GAT-3`Ende
- 5`NCR 1 capture Probe: 19-mer, Position 161-179
5`Ende-Biotin-GGT AGC CAC TAT AGG TGG G-3`Ende
- 5`NCR 2 capture Probe: Sequenz nicht bekannt

Waschlösung: 1%iges PBS

Eppendorfgefäße, Einmalhandschuhe, Pipetten, Pipettenspitzen, Mikrozentrifuge, Schüttler, heizbarer Mikrotiterplattenschüttler, -wascher, ELISA-Reader

Durchführung:

40 µl Denaturierungslösung wurden mit 20 µl Amplifikat vermischt, zentrifugiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwei Funktionskontrollen à 60 µl wurden in 10 Minuten auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurde mit Hybridisierungslösung auf 500 µl aufgefüllt, gemischt, zentrifugiert und davon je 200 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C auf dem Mikrotiterplattenschüttler wurde die Platte mit je 250 µl Waschlösung gewaschen, mit 200 µl Konjugat beschichtet und 30 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem zweiten Waschschrift wurden je 200 µl Substrat in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Zusätzlich wurde je 200 µl Substrat in zwei leere Vertiefungen für den Leerwert gegeben. Schließlich wurde nach 30minütiger Inkubation im Dunkeln bei 37 °C auf dem Schüttler die Extinktion in dem ELISA-Reader bei 405 nm (Referenz Filter 492 nm) gemessen.

Testauswertung nach Anleitung des Herstellers:

Von allen Extinktionswerten ist der Leerwert zu subtrahieren. Für die Gültigkeit des Tests sollen die Funktionskontrollen einen Extinktionswert von $E > 1,5$ haben.

Der Cut-off wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Cut-off} = 3 \times E_{\text{neg.Kontr.}}$$

Eine Probe gilt als **positiv**, wenn

$$E_{\text{Probe}} > \text{Cut-off}$$

Eine Probe gilt als **negativ**, wenn

$$E_{\text{Probe}} < \text{Cut-off}$$

Liegt die Extinktion im Bereich von $\pm 20 \%$ um den Cut-off, soll der Test wiederholt werden.

E = Extinktion, neg.Kontr. = Serumnegativkontrolle

Zusätzlich zu den Angaben des Herstellers haben wir

- Proben, deren Extinktionswert $E > 3,000$ war, als GBV-C-RNA stark positiv gewertet.
- Proben, die bei verschiedenen Testdurchläufen sowohl positive als auch negative Ergebnisse erbrachten, als fraglich positiv gewertet (siehe auch S. 47-48).

2.3 Nachweis von GBV-C-E2-Antikörpern

Der momentan einzige bekannte GBV-C-Antikörpertest von Boehringer Mannheim befindet sich in der praktischen Erprobung. Da die Anzahl der zur Verfügung gestellten Testkits begrenzt war, konnten nur 182 der 200 Patienten auf Antikörper untersucht werden.

Testprinzip:

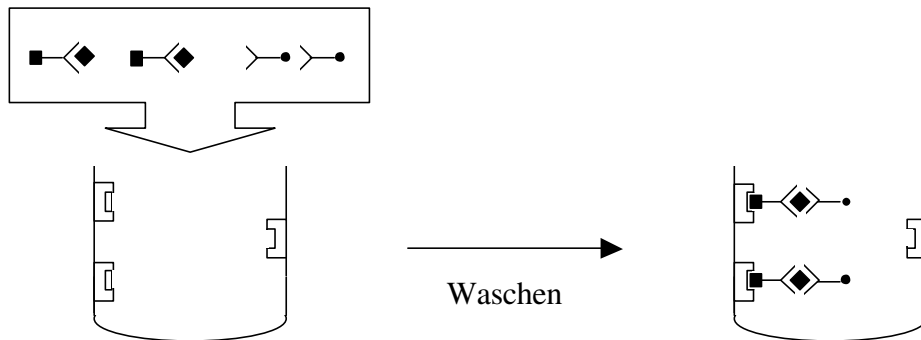
Mit dem μ Plate Anti-HGenv® von Boehringer Mannheim werden qualitativ IgG-Antikörper gegen das GBV-C-E2-Protein im Serum oder Plasma nachgewiesen.

Sind Antikörper gegen das E2-Protein von GBV-C im Serum vorhanden, lagern sich diese an das in der Inkubationslösung enthaltene GBV-C-E2-Antigen, welches sich wiederum an einen biotinylierten Anti-E2-Antikörper gebunden hat. Letzterer kann sich an die mit Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte anheften.

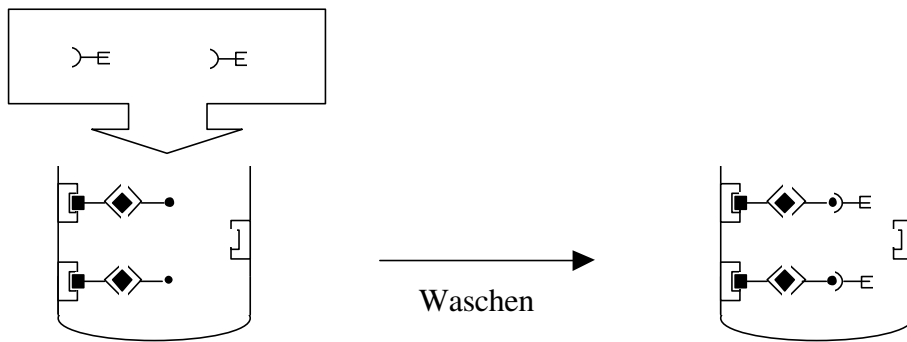
Nach dem Waschen wird mit der Konjugatlösung ein POD-markierter Anti-H-Fc γ -Antikörper hinzugegeben, der sich an die H-Kette des Fc-Stücks des nachzuweisenden Antikörpers bindet.

Nachdem die Mikrotiterplatte gewaschen und mit einer Substrat-Chromogenlösung (ABTS/H₂O₂) beschichtet wurde, wandelt die Peroxidase das Substrat in ein farbiges Produkt um. Die Extinktion ist proportional zur Menge der gebundenen Antikörper.

Inkubationslösung + positive Probe



Konjugatlösung



Substrat-Chromogenlösung

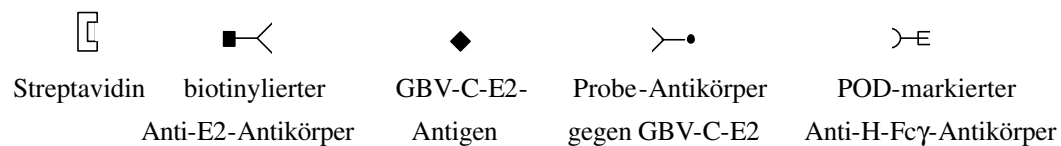
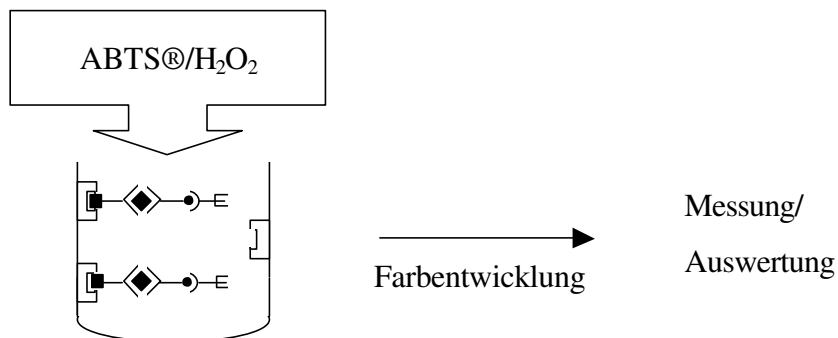


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des GBV-C-E2-Antikörnernachweis

Um unspezifische Bindungen an das Plastik der Mikrotiterplatte auszuschließen, kann ein Bestätigungstest durchgeführt werden. Dieser erfolgt analog zu dem oben beschriebenen Testablauf mit dem Unterschied, daß kein HGV-E2-Antigen zugegeben wird. Kommt es nun auch zu einer Farbentwicklung mit einer Extinktion im gleichen Bereich wie bei der normalen Testdurchführung, muß davon ausgegangen werden, daß es durch Störeinflüsse im Probenmaterial zu unspezifischen Bindungen kam. Dann gilt die Probe als negativ.

Material:

<p>µPlate Anti-HGenv® Testkit, Firma: Boehringer Mannheim, Bestellnummer: 1822616</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Probenpuffer zur Probenvorverdünnung: 40 mmol/l Phosphat; pH 7,0; Rinderserumbestandteile ■ Inkubationslösung: Puffer (40 mmol/l Phosphat; pH 7,0; Rinderserumbestandteile; Anti-HGV-E2-Biotin (Maus, monoklonal)) vermischt im Verhältnis 5 + 1 mit HGV envelope (E2) Antigen (rekombinant aus CHO-Zellen) ■ Konjugatlösung: Puffer (40 mmol/l Phosphat; pH 7,0) vermischt im Verhältnis 25 + 1 mit anti-H-Fcγ-Antikörper-POD (vom Schaf; $\text{POD} \geq 0,4 \text{ U/l}$) ■ Substratlösung: Puffer (100 mmol/l Phosphat/Citrat; pH 4,4; 3,2 mmol/l H_2O_2) mit gelöster Chromogen-Tablette ABTS® 14,3 mg ■ Waschlösung: entionisiertes Wasser vermischt im Verhältnis 14 + 1 mit Konzentrat (100 mmol/l Phosphat; pH 7,4; NaCl, Tween 20) ■ Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten ■ Negative Kontrolle: Humanserum ■ Positive Kontrolle: Humane anti-HGenv Antikörper in Humanserum
<p>96-well Mikrotiterplatten Wascher, Mikrotiterplattenschüttler, ELISA-Reader, Pipetten, Mehrkanalpipette, Mikrozentrifuge, Schüttler, Einmalhandschuhe</p>

Durchführung:

Die Inkubations- sowie die Konjugatlösung wurden mindestens 30 Minuten, die Substratlösung lichtgeschützt 60 Minuten vor Testdurchführung hergestellt und auf Raumtemperatur gebracht. Zuerst wurden 10 µl Serum sowie je zwei Positiv- und zwei Negativkontrollen mit 200 µl Probenpuffer vorverdünnt. In die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen wurden nun je 20 µl der verdünnten Proben (1 µl effektiv eingesetztes Probenvolumen) einpipetiert und 80 µl der Inkubationslösung

dazugegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei Raumtemperatur. Die Platte wurde gewaschen und mit je 100 µl Konjugatlösung beschichtet. Nach einer einstündigen Inkubation auf einem Mikrotiterplattenschüttler wurde die Platte erneut gewaschen und im Anschluß mit je 100 µl Substratlösung beschichtet. Zusätzlich wurde eine Vertiefung der Platte für den Leerwert nur mit Substrat befüllt. Nun mußte die Platte eine Stunde im Dunkeln inkubiert werden. Die Extinktion wurde im Anschluß mittels eines ELISA Readers bei 405 nm (Reference Filter 492 nm) gemessen.

Die Durchführung des Bestätigungstestes erfolgte analog mit dem Unterschied, daß in die Inkubationslösung kein HGV-E2-Antigen zugemischt wurde und keine Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt wurden.

Testauswertung nach Anleitung des Herstellers:

Von allen Extinktionswerten ist der Leerwert abzuziehen.

Für die Gültigkeit des Testes müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

$$E_{\text{neg.Kontr.}} \leq 0,25 E$$

$$E_{\text{pos.Kontr.}} - E_{\text{neg.Kontr.}} \geq 0,5 E$$

Der Cut-off wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Cut-off} = 0,2 \times E_{\text{pos.Kontr.}} + E_{\text{neg.Kontr.}}$$

Die Probe gilt als Anti-HGenv **positiv**, wenn

$$E_{\text{Probe}} \geq \text{Cut-off}$$

Die Probe gilt als Anti-HGenv **negativ**, wenn

$$E_{\text{Probe}} < \text{Cut-off}$$

Eine Probe gilt nur dann weiterhin als bestätigt positiv, wenn:

$$E_{\text{Probe normale Testführung}} : E_{\text{Probe Bestätigungstest}} > 1,5$$

E = Extinktion, neg.Kontr. = negative Kontrolle, pos.Kontr. = positive Kontrolle

Zusätzlich zu den Angaben des Herstellers haben wir Proben als fraglich positiv gewertet, wenn der Quotient ($E_{\text{Probe normale Testführung}} : E_{\text{Probe Bestätigungstest}}$) zwischen 1,5 und 2,0 lag.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv der Vorstudie und der Nachuntersuchung

3.1.1 Verbleib

Für die Verlaufskontrolle von GBV-C Infektionen bei Dialysepatienten konnten von den 390 Patienten der Vorstudie [Dissertation I. Klingelhöfer 1998] 200 Patienten (51 %) nachuntersucht werden. Die Proben der Vorstudie wurden von Dezember 1993 bis Oktober 1994 gesammelt. Der Zeitraum, in dem die Proben der vorliegenden Studie gesammelt wurden, umfaßte vier Monate, von Dezember 1996 bis März 1997. Die meisten Proben erhielten wir im Dezember 1996 und im Januar 1997, so daß die Patienten etwa 2 ½ Jahre später nachuntersucht werden konnten.

Von den 200 Patienten, die für unsere Nachuntersuchung zur Verfügung standen, waren nach Angaben der Ärzte 188 Patienten weiterhin dialysepflichtig, während 12 in der Zwischenzeit transplantiert worden waren.

Wieviel Patienten aus den einzelnen Gruppen mit den verschiedenen Befundkombinationen nachuntersucht werden konnten, zeigt Tabelle 3.1. Daraus ist ersichtlich, daß aus allen Gruppen in etwa gleich große Anteile (zwischen 42 und 54 %) an Patienten nachuntersucht werden konnten.

Tab. 3.1: Anzahl der Patienten der Vorstudie und der Nachuntersuchung, gruppiert nach ihrer Befundkombination, und Anteil der Patienten, die pro Gruppe nachuntersucht werden konnten

Gruppe	Befund Vorstudie		Anzahl Patienten		
	GBV-C-RNA	E2-Antikörper	Vorstudie	Nachuntersuchung	nachuntersucht
I	+	–	61	33	54 %
II	+	+	12	5	42 %
III	–	+	99 ^a	47 ^b	47 %
IV	–	–	218	115	53 %
gesamt			390	200	51 %

^a davon 5 Patienten mit fraglich positivem GBV-C-Anti-E2-Befund in der Vorstudie

^b davon 4 Patienten mit fraglich positivem GBV-C-Anti-E2-Befund in der Vorstudie

Insgesamt 190 (49 %) der ursprünglich 390 Patienten standen für unsere Nachuntersuchung nicht mehr zur Verfügung. Von diesen 190 waren 130 Patienten zwischenzeitlich verstorben. 37 Patienten, davon 29 Patienten inzwischen transplantiert, sind wegen Umzug nicht mehr erreicht worden, da die neue Adresse den damals zuständigen Dialysezentren nicht bekannt war. Weil aus Gründen des Datenschutzes nur Initialen, Geburtsdatum und Geschlecht der Patienten bekannt waren, konnten 23 Patienten (6 %) in den Dialysezentren nicht mehr identifiziert werden. Tabelle 3.2 zeigt die Aufteilung dieser 190 Patienten in bezug auf ihre GBV-C-Befundkombination aus der Vorstudie.

Tab. 3.2: Anzahl der Patienten aus der Vorstudie, die entweder verstorben, unbekannt verzogen oder nicht mehr identifiziert werden konnten und damit nicht mehr für die Nachuntersuchung zur Verfügung standen

Gruppe	Befund Vorstudie		Anzahl Patienten			
	GBV-C-RNA	E2-Antikörper	verstorben	verzogen	nicht identifiziert	gesamt
I	+	–	20	6	2	28
II	+	+	7	0	0	7
III	–	+	33	12	7	52
IV	–	–	70	19	14	103
gesamt			130	37 ^a	23	190

^a davon 29 Patienten inzwischen transplantiert

3.1.2 Zusammensetzung des Patientenkollektivs bei der Vorstudie und bei der Nachuntersuchung

Um festzustellen, ob die nachuntersuchte Patientengruppe verglichen mit der Patientengruppe der Vorstudie bezüglich ihrer Zusammensetzung repräsentativ ist, ferner, ob Patienten mit bestimmten Merkmalen vermehrt verstorben sind, werden Alter, Geschlecht, Dialysedauer, Transfusionshäufigkeit und Infektionsstatus bezüglich HCV und GBV-C dieser Gruppen in den folgenden Tabellen dargestellt (Kapitel 3.1.2.1 – 3.1.2.5).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Patientengruppe der Nachuntersuchung hinsichtlich ihrer Zusammensetzung der der Vorstudie sehr ähnlich ist und damit wahrscheinlich repräsentativ ist.

Bei der Betrachtung der Merkmale der verstorbenen Patienten ergab sich, außer daß erwartungsgemäß ältere Patienten verstorben sind, kein Hinweis auf eine Selektion.

3.1.2.1 Alter

Um die Altersstruktur der Patienten darzustellen, haben wir die Patienten in Altersgruppen von 10 Jahren eingeteilt.

Das Alter der Patienten bezieht sich auf den Zeitpunkt der Probenentnahme, d.h. bei den Patienten der Vorstudie 1994 und bei den Patienten der Nachuntersuchung 1997. Das Alter der Patienten, die zwischenzeitlich verstorben sind, bezieht sich auf den Zeitpunkt der Probenentnahme der Vorstudie, also 1994 (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Anzahl und Anteil der Patienten der Vorstudie, der Nachuntersuchung und der verstorbenen Patienten in den einzelnen Altersgruppen und Anteil der verstorbenen Patienten pro Altersgruppe

Alter in Jahren	Anzahl Patienten						pro Altersgruppe verstorben %
	Vorstudie		Nachuntersuchung		verstorben		
	n	%	n	%	n	%	
12-21	6	1,5	1	0,5	1	0,8	16,7
22-31	39	10,0	23	11,5	3	2,3	7,7
32-41	45	11,5	23	11,5	8	6,2	17,8
42-51	54	13,8	30	15,0	10	7,7	18,5
52-61	92	23,6	39	19,5	32	24,6	34,8
62-71	75	19,2	49	24,5	27	20,8	36,0
72-81	55	14,1	28	14,0	30	23,1	54,5
82-91	23	5,9	7	3,5	18	13,8	78,3
92-101	1	0,3	0	0	1	0,8	100,0
gesamt	390	100	200	100	130	100	33

Erwartungsgemäß sind überproportional viele ältere Patienten verstorben. Da aber die Patienten nach 2 ½ Jahren zum Teil in die nächst höhere Altersgruppe eingeordnet wurden, ist die Anzahl der Patienten in den einzelnen Altersgruppen sowohl in der Vorstudie als auch in der Nachuntersuchung ähnlich verteilt. Die Altersstruktur der Patienten ist demnach in der Nachuntersuchung vergleichbar mit der der Vorstudie.

3.1.2.2 Geschlecht

Männliche und weibliche Patienten sind in der Vorstudie und der Nachuntersuchung ähnlich oft vertreten (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Anzahl und Anteil männlicher und weiblicher Patienten in Vorstudie, Nachuntersuchung und bei den verstorbenen Patienten

Geschlecht	Vorstudie		Nach- untersuchung		verstorben	
	n	%	n	%	n	%
männlich	203	52,1	102	51,0	72	55,4
weiblich	187	47,9	98	49,0	58	44,6
gesamt	390	100	200	100	130	100

3.1.2.3 Dialysedauer

In den Patientenbögen wurden Angaben zu dem Beginn der Dialyse gemacht. Für die Unterscheidung der Patienten nach ihrer Dialysedauer haben wir eine Unterteilung mit einem Dialysebeginn vor 1985, von 1985 bis 1988, von 1989 und 1991 und von 1992 bis 1994 vorgenommen.

Die Aufteilung der Patienten nach ihrer Dialysedauer ergibt keinen deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Anzahl und Anteil der Patienten mit Dialysebeginn in einem bestimmten Zeitraum in Vorstudie, Nachuntersuchung und bei den verstorbenen Patienten

Dialysebeginn	Vorstudie ^a		Nach- untersuchung ^a		verstorben	
	n	%	n	%	n	%
vor 1985	99	25,4	56	28,1	29	22,3
1985 – 1988	69	17,7	36	18,1	26	20,0
1989 – 1991	104	26,7	43	21,6	40	30,8
1992 – 1994	117	30,1	64	32,1	35	26,9
gesamt	389	100	199	100	130	100

^a bei einem Patient ist der Dialysebeginn nicht bekannt

3.1.2.4 Transfusionshäufigkeit

Die in den Patientenbögen angegebene Transfusionshäufigkeit wurde eingeteilt in: keine, ein bis zehn oder mehr als zehn Transfusionen erhalten (Tab 3.6).

Tab. 3.6: Anzahl und Anteil der Patienten mit einer bestimmten Anzahl von erhaltenen Transfusionen in Vorstudie, Nachuntersuchung und bei den verstorbenen Patienten

Transfusions- häufigkeit	Vorstudie		Nach- untersuchung		verstorben	
	n	%	n	%	n	%
keine	96	24,6	50	25,0	23	17,7
1 – 10	147	37,7	74	37,0	53	40,8
> 10	147	37,7	76	38,0	54	41,5
gesamt	390	100	200	100	130	100

Die Patienten der Vorstudie, der Nachuntersuchung und die verstorbenen Patienten sind in den nach ihrer Transfusionshäufigkeit eingeteilten Gruppen in etwa gleichmäßig vertreten.

3.1.2.5 Infektionsstatus

Die Untersuchungen auf HCV und GBV-C wurden in unserem Institut [Dissertation Lendeckel, 2000/Klingelhöfer, 1998] mit den Seren, die 1993/94 gesammelt wurden, durchgeführt. Die Anzahl und der Anteil der Patienten in der Vorstudie, der nachuntersuchten Patienten und der Patienten, die inzwischen verstorben sind, bezüglich ihres Infektionsstatus werden in Tab. 3.7 und Tab. 3.8 dargestellt.

Demnach besteht zwischen den drei Gruppen in bezug auf HCV- und GBV-C-Infektionsstatus kein deutlicher Unterschied.

Tab. 3.7: Anzahl und Anteil der Patienten in Vorstudie, Nachuntersuchung und bei den verstorbenen Patienten mit HCV-Antikörpern mit und ohne HCV-RNA [Lendeckel, 2000]

HCV-Befund-kombination		Vorstudie		Nachuntersuchung		verstorben	
RNA	AK	n	%	n	%	n	%
+	+	99	25,4	48	24,0	39	30,0
–	+	74	19,0	36	18,0	29	22,3
–	–	217	55,6	116	58,0	62	47,7
gesamt		390	100	200	100	130	100

Tab. 3.8: Anzahl und Anteil der Patienten mit einer bestimmten GBV-C-Befundkombination aus der Vorstudie [Klingelhöfer, 1998] in Vorstudie, Nachuntersuchung und bei den verstorbenen Patienten

GBV-C-Befund-kombination		Vorstudie		Nachuntersuchung		verstorben	
RNA	AK	n	%	n	%	n	%
+	–	61	15,6	33	16,5	20	15,4
+	+	12	3,1	5	2,5	7	5,4
–	+	99 ^a	25,4	47 ^b	23,5	33 ^c	25,4
–	–	218	55,9	115	57,5	70	53,8
gesamt		390	100	200	100	130	100

^a davon 5 Patienten GBV-C-Anti-E2 fraglich positiv, ^b davon 4 Patienten GBV-C-Anti-E2 fraglich positiv, ^c davon 1 Patient GBV-C-Anti-E2 fraglich positiv

3.2 GBV-C-Befunde der Nachuntersuchung

3.2.1 Untersuchung auf GBV-C-RNA

Alle 200 Seren wurden mit dem weiterentwickelten Primerpaar aus der 5'NCR-Region von Boehringer Mannheim (5'NCR 2) einmal auf GBV-C-RNA untersucht, da bei der Vorstudie von Klingelhöfer [1998] mit diesem Primerpaar 96 % der positiven Proben erfaßt wurden.

Wiederholungsuntersuchungen wurden nur mit Seren durchgeführt, die gegenüber der Vorstudie divergierende Ergebnisse zeigten. Positive Proben, die bei Klingelhöfer negativ waren, wurden noch einmal mit dem Primerpaar 5'NCR 2 getestet. Bei negativem Befund wurden sie ein weiteres Mal mit dem Primerpaar 5'NCR 2 untersucht, so daß dann insgesamt drei Ergebnisse vorlagen.

Bei Proben, die nach der Untersuchung von Klingelhöfer GBV-C-RNA positiv und in der vorliegenden Untersuchung negativ waren, wurde die noch aus der Erstuntersuchung vorhandene, tiefgefrorene cDNA noch einmal aufgetaut und mit dem Primerpaar 5'NCR 2 untersucht. Zusätzlich wurde erneut Serum dieser Patienten aufgetaut und der komplette Untersuchungsgang wiederholt. Dabei wurden die Proben mit den jeweiligen Primerpaaren getestet, die bei der Vorstudie von Klingelhöfer ein positives Ergebnis zeigten.

3.2.1.1 Ergebnis der ersten Untersuchung auf GBV-C-RNA

Bei der ersten Untersuchung auf GBV-C-RNA wurden sechs Testdurchläufe benötigt, um alle 200 Seren einmal mit dem Primerpaar 5'NCR 2 zu testen (Auswertung Tab. 3.9) und weitere zwei Testdurchläufe, um die Nachtestungen durchzuführen (Auswertung Tab. 3.11).

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der PCR wurde jeweils eine Verdünnungsreihe einer cDNA eines stark positiven Kontrollserums eingesetzt. In der Tab. 3.9. ist unter Empfindlichkeit die Verdünnungsstufe angegeben, bis zu der die Verdünnung ein positives Ergebnis zeigte.

Divergierende Ergebnisse wurden wie folgt differenziert:

Neu positiv sind die Seren, die bei der Vorstudie GBV-C-RNA negativ und bei der Nachuntersuchung positiv waren; **neu negativ** sind die Seren, die bei der Vorstudie positiv und bei der Nachuntersuchung negativ waren. Die Seren, die sowohl in der Vorstudie als auch in der Nachuntersuchung das gleiche Ergebnis hatten, werden in der Tab. 3.9 unter „übereinstimmende Ergebnisse“ aufgeführt.

Tab. 3.9: Auswertung der einzelnen Testdurchläufe bei der ersten Untersuchung auf GBV-C-RNA

Test	Empfindlichkeit	Cut-off	Anzahl Proben						
			untersucht	stark positiv	positiv	negativ	divergierende Ergebnisse		übereinstimmende Ergebnisse
							neu positiv	neu negativ	
1.	1:256	0,1320	25	0	1	24	1	2	22
2.	1:64	0,0780	38	5	0	33	1	2	35
3.	1:64	0,1455	42	7	1	34	2	1	39
4.	1:256	0,3960	40	8	2	30	2	4	34
5.	1:256	0,0660	36	7	1	28	3	2	31
6.	1:64	0,0555	19	2	0	17	0	2	17
7.	1:16	0,0975	Nachuntersuchungen						
8.	1:16	0,0495							
gesamt			200	29	5	166	9	13	178

Im Grenzbereich von $\pm 20\%$ um den Cut-off lag keine Extinktion, so daß alle Proben eindeutig den Bewertungen stark positiv, positiv oder negativ zugeordnet werden konnten. Danach waren fünf Seren GBV-C-RNA stark positiv, 29 Seren positiv und 166 Seren negativ. Dabei zeigten 22 Seren von der Vorstudie abweichende Ergebnisse.

3.2.1.2 Ergebnis der Nachtestungen

In der ersten Untersuchung waren neun Seren positiv, die in der Vorstudie GBV-C-RNA negativ waren.

Bei erneuter Testung waren fünf Seren wiederum GBV-C-RNA positiv. Bei vier Seren konnte das positive Ergebnis nicht reproduziert werden. Sie blieben auch bei einem dritten Testansatz negativ. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß der Virustiter so gering ist, daß nicht bei jeder Untersuchung RNA nachgewiesen werden konnte. Dafür spricht, daß die Empfindlichkeit der Amplifikationen der Wiederholungsuntersuchungen geringer war als die der ersten Untersuchung. Es könnte sich auch um falsch positive Ergebnisse in der ersten Untersuchung handeln, die durch Kontaminationen zustande gekommen sein müßten. Jedoch wurden zwei dieser vier Seren in voneinander unabhängigen Testdurchläufen, die zwei anderen Seren gemeinsam, aber nicht nacheinander, also nicht in unmittelbarem Kontakt untersucht. Bei drei der vier Seren waren die davor und danach untersuchten Proben negativ.

Daher wurden diese vier Seren trotz der Testung zweimal negativ und einmal positiv als fraglich positiv gewertet (Tab. 3.11).

Von den in der ersten Untersuchung GBV-C-RNA negativ getesteten Seren waren 13 Seren in der Vorstudie GBV-C-RNA positiv. Diese 13 Seren wurden noch einmal mit dem Primerpaar 5'NCR 2 und zusätzlich mit den Primern untersucht, die bei der Voruntersuchung ein positives Ergebnis gezeigt haben (Tab. 3.10).

Diese 13 Seren blieben auch bei den Nachtestungen GBV-C-RNA negativ (Tab. 3.11).

Tab. 3.10: Eingesetzte Primerpaare bei der zweiten Nachtestung

Vorstudie					Nachuntersuchung zweite Nachtestung
Anzahl Seren	5'NCR 1	5'NCR 2	NS5 1	NS5 2	eingesetzte Primer
5	+	+	+	+	5'NCR 1, 5'NCR 2, NS5 1
1	+	+	+	–	5'NCR 1, 5'NCR 2, NS5 1
2	+	+	–	–	5'NCR 1, 5'NCR 2
2	+	–	–	–	5'NCR 1
2	–	+	–	–	5'NCR 2
1	–	+	+	+	5'NCR 2, NS5 1

3.2.1.3 Endgültiges Ergebnis der Untersuchung auf GBVC-RNA

Von den 200 getesteten Seren waren 30 GBV-C-RNA positiv (davon 27 stark positiv), vier fraglich positiv und 166 Seren negativ.

Tab. 3.11: Endgültige Bewertung der Ergebnisse aller Untersuchungen auf GBV-C-RNA

Anzahl Seren	RNA- Vorbefund	Nachuntersuchung				
		erste Unter- suchung	Nachtestungen		endgültiges Ergebnis	Anzahl Seren
			1.	2.		
25	+	+	n. d.	n. d.	positiv	30
5	–	+	+	n. d.	positiv	
4	–	+	–	–	fraglich positiv	4
153	–	–	n. d.	n. d.	negativ	166
13	+	–	–	–	negativ	
200	gesamt					200

n. d. = nicht durchgeführt

3.2.2 Untersuchung auf GBV-C-E2-Antikörper (Anti-E2)

Da die Anzahl der zur Verfügung gestellten Testkits begrenzt war, konnten nur 182 der 200 Patienten auf Antikörper untersucht werden. Bei der Auswahl der Patienten wurde darauf geachtet, daß alle GBV-C-RNA oder Anti-E2 positiven Seren der Voruntersuchung von Klingelhöfer oder auch GBV-C-RNA positive Seren der vorliegenden Studie auf E2-Antikörper untersucht wurden.

Folglich waren die 18 nicht auf Antikörper untersuchten Seren bei der Voruntersuchung GBV-C-RNA und Anti-E2 negativ, sowie bei der vorliegenden Studie GBV-C-RNA negativ.

Nach der Auswertung des ersten Testdurchlaufes wurde bei allen positiven Proben ein Bestätigungstest durchgeführt. Bei grenzwertig negativen Proben (Proben, die bis 10 % unterhalb des Cut-off lagen) sowie bei negativen Proben, die bei der Voruntersuchung von Klingelhöfer positiv oder fraglich positiv waren, wurde der Antikörpertest wiederholt.

3.2.2.1 Ergebnis der ersten Untersuchung auf Anti-E2

Die Untersuchung der 182 Seren wurde in zwei Testdurchläufen durchgeführt. Danach waren 133 GBV-C-Anti-E2 negativ und 49 positiv. Für 11 dieser Seren lagen die Extinktionen in dem Bereich von $\pm 10\%$ um den Cut-off (für vier Seren *über* dem Cut-off und sieben Seren *darunter*). Die Auswertung der einzelnen Testdurchläufe einschließlich Extinktionen der Kontrollen und des Cut-off sind in Tab. 3.12 dargestellt.

Alle Seren mit positiven Ergebnissen wurden einem Bestätigungstest unterzogen, während bei grenzwertig negativen Proben (bis zu 10 % unterhalb des Cut-off) der Antikörpertest wiederholt wurde.

Tab. 3.12: Auswertung der einzelnen Testdurchläufe bei der ersten Untersuchung auf GBV-C-E2-Antikörper

	$E_{\text{pos.Kontr.}}$	$E_{\text{neg.Kontr.}}$	$E_{\text{pos.Kontr.}}$ - $E_{\text{neg.Kontr.}}$	Anzahl Proben		
				unter- sucht	positiv/davon grenzwertig	negativ/ davon grenzwertig
Bedingung	keine	< 0,25	> 0,50			
1. Test	0,71	0,01	0,70	91	22/2	69/4
2. Test	0,58	0,01	0,57	91	27/2	64/3
				182	49/4	133/7

$E_{\text{pos.Kontr.}}$ = Extinktion der Positivkontrolle

$E_{\text{neg.Kontr.}}$ = Extinktion der Negativkontrolle

3.2.2.2 Ergebnis des Bestätigungstests

Bei dem Bestätigungstest wurde kein GBV-C-E2-Antigen (E2-Antigen) zugegeben, so daß bei einem positiven Signal auch im Bestätigungstest das positive Signal des Tests nicht auf Antikörper zurückgeführt werden kann, sondern z.B. durch unspezifische Bindungen an das Plastik der Mikrotiterplatte verursacht ist.

Lag der Quotient der Extinktionen bei Testung mit und ohne E2-Antigen über 2,0, galt die Probe weiterhin als positiv, lag er zwischen 1,5 und 2,0, galt die Probe als Anti-E2 fraglich positiv, lag er unter 1,5, galt die Probe als negativ.

Der Quotient war bei 46 der 49 positiven Proben aus der ersten Untersuchung und bei den drei Proben, die erst in den Nachtestungen positiv geworden sind, über 2,0 und bestätigte damit die positiven Ergebnisse. Bei drei Proben war der Quotient zwischen 1,5 und 2,0. Auch bei der normalen Testdurchführung lagen die Extinktionswerte dieser Proben bis max. 20 % über dem Cut-off. Daher wurden diese drei Seren als fraglich positiv bewertet (Tab. 3.13, S. 52).

3.2.2.3 Ergebnis der Nachtestungen

Insgesamt wurden 18 Seren, die bei der ersten Untersuchung Anti-E2 negativ waren, nachgetestet. Von diesen 18 Seren waren:

- a) sieben Seren mit Extinktionen bis zu 10 % unterhalb des Cut-off
- b) elf Seren, die bei der Vorstudie von Klingelhöfer Anti-E2 positiv oder fraglich positiv waren

zu Punkt a:

Die Extinktionen der sieben Seren lagen in der ersten Untersuchung im Grenzbereich bis 10 % unter dem Cut-off. In beiden Nachtestungen waren davon vier Seren wieder negativ, diesmal keines im Grenzbereich, aber zwei davon mit Extinktionen zwischen 10 und 20 % unter dem Cut-off. Wir haben alle vier Seren als Anti-E2 negativ bewertet.

Zwei der sieben grenzwertig negativen Seren sind in beiden Nachtestungen positiv und auch endgültig als Anti-E2 positiv bewertet worden.

Ein Serum war in den Nachtestungen einmal positiv und einmal negativ. Der Quotient der Extinktionen bei Testung mit und ohne E2-Antigen lag über 2,0. Dieses Serum werteten wir Anti-E2 fraglich positiv (Tab. 3.13).

zu Punkt b:

Von den elf Seren, die bei der Vorstudie Anti-E2 positiv oder fraglich positiv und in der Nachtestung Untersuchung Anti-E2 negativ waren, wurde ein Serum in beiden Nachtestungen positiv. Der Quotient der Extinktionen bei Testung mit und ohne E2-Antigen lag bei 3,29. Damit wurde es als Anti-E2 positiv gewertet. Die anderen zehn nachuntersuchten Seren blieben alle Anti-E2 negativ (Tab. 3.13).

3.2.2.4 Endgültiges Ergebnis der Untersuchung auf Anti-E2

Die endgültige Bewertung aller Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen ist in Tabelle 3.13 dargestellt. Der in der Tabelle angegebene Quotient errechnet sich aus der Extinktion der Proben in der normalen Testdurchführung (mit E2-Antigen) dividiert durch die Extinktion im Bestätigungstest (ohne E2-Antigen). Lagen für eine Probe mehrere positive Ergebnisse aus der ersten Untersuchung oder den Nachtestungen vor, wurden auch mehrere Quotienten pro Probe gebildet.

Eine Probe galt als **positiv**, wenn ihre Extinktion \geq Cut-off und gleichzeitig die Quotienten $> 2,0$ waren. Sie galt als **fraglich positiv**, wenn ihre Extinktion \geq Cut-off und gleichzeitig der Quotient zwischen 1,5 und 2,0 lag oder der Quotient zwar größer

2,0 war, aber die Probe bei den Untersuchungen zweimal negativ und einmal positiv getestet wurde. Bei Werten kleiner als der Cut-off wurde die Probe als **negativ** gewertet.

Von den 182 auf Anti-E2 getesteten Patienten waren 49 Anti-E2 positiv, 4 Anti-E2 fraglich positiv und 129 Anti-E2 negativ (Tab. 3.13).

Tab. 3.13: Endgültige Bewertung aller Ergebnisse der Untersuchungen auf Anti-E2

Anzahl Seren	Vorstudie	Nachuntersuchung					
	AK-Befund	erste Untersuchung	Nachtestungen		Quotienten	Endgültiges Ergebnis	Anzahl Seren
			1.	2.			
16	+	+	n. d.	n. d.	> 2,0	positiv	49
2	+	(-)	+	+	> 2,0	positiv	
1	+	-	+	+	> 2,0	positiv	
1	(+)	+	n. d.	n. d.	> 2,0	positiv	
29	-	+	n. d.	n. d.	> 2,0	positiv	
1	+	+	n. d.	n. d.	>1,5 und < 2,0	fraglich positiv	4
1	+	(-)	+	-	> 2,0	fraglich positiv	
2	-	+	n. d.	n. d.	>1,5 und < 2,0	fraglich positiv	
7	+	-	-	n. d.	n. d.	negativ	129
1	+	(-)	-	n. d.	n. d.	negativ	
3	(+)	-	-	n. d.	n. d.	negativ	
115	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	negativ	
3	-	(-)	-	-	n. d.	negativ	
182	gesamt						182

(+) fraglich positiv, (-) grenzwertig negativ (Kapitel 3.2.2.3, Punkt a), n. d. = nicht durchgeführt

3.3 Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten

3.3.1 Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten mit GBV-C-Virämie ohne E2-Antikörper (Gruppe I)

Von den 61 Patienten der Vorstudie mit GBV-C-Virämie bei gleichzeitigem Fehlen von Antikörpern gegen das E2 Protein von GBV-C konnten 33 nachuntersucht werden. Bei 25 Patienten (76 %) war weiterhin GBV-C-RNA nachweisbar. Einer dieser 25 Patienten war bei der Nachuntersuchung Anti-E2 fraglich positiv, während bei 24 Patienten (73 %) keine Antikörper nachgewiesen wurden. Bei fünf Patienten (15 %) wurden Antikörper festgestellt, ohne daß eine Virämie nachgewiesen wurde. Bei drei Patienten (9 %) wurden weder GBV-C-RNA noch Antikörper nachgewiesen (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Ergebnisse der Nachuntersuchung bei den 33 Dialysepatienten mit GBV-C-Virämie ohne GBV-C-E2-Antikörper aus der Vorstudie

Vorbefund				Nachuntersuchung Anzahl Patienten mit			
Gruppe	RNA	AK	Anzahl	RNA+ AK –	RNA+ AK +	RNA– AK +	RNA– AK –
I	+	–	33	24	1 ^a	5	3

RNA = GBV-C-RNA, AK = GBV-C-E2-Antikörper, ^a AK fraglich positiv

3.3.1.1 Häufigkeit des Verschwindens der GBV-C-Virämie

Insgesamt haben acht Patienten (24 %) ihre Virämie in 2 ½ Jahren verloren. Nimmt man an, daß alle Patienten ihre Virämie gleichmäßig verlieren, würden 9,7 % der Infizierten ihre Virämie pro Jahr verlieren. Damit hätten alle Patienten nach ca. zehn Jahren ihre Virämie verloren. Da wir aber den Infektionszeitpunkt nicht kennen, können wir daraus den Zeitraum, in dem durchschnittlich eine Virämie vorhanden ist, auf mindestens fünf Jahre nur schätzen.

Aus der Gruppe der Patienten ohne GBV-C-Infektionsmarker in der Vorstudie wurde bei vier Patienten ein positiver Anti-E2-Befund und bei einem weiteren Patienten ein

fraglich positiver Anti-E2-Befund jeweils ohne Virämie festgestellt (siehe auch S. 60). Ausgehend davon, daß der Nachweis von E2-Antikörpern als zurückliegende Infektion gilt, haben diese fünf Patienten sich in den 2 ½ Jahren neu mit GBV-C infiziert und ihre Virämie schon wieder verloren. Damit ist auch eine relativ kurze Virämiedauer von unter zwei Jahren möglich.

3.3.1.2 Einflußfaktoren bei der Serokonversion

Um festzustellen, ob das Verschwinden der GBV-C-RNA und das Erscheinen der E2-Antikörper von bestimmten Merkmalen (Alter, Geschlecht, Transfusionsstatus, Dialysedauer, HCV-Infektionsstatus) abhängt, wurden die 24 Patienten, die nicht serokonvertiert sind, mit den neun Patienten, die serokonvertiert sind, bezüglich ihrer Merkmale verglichen (Tab. 3.15-Tab. 3.17). Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. Somit war kein prognostischer Marker für eine zeitlich begrenzte Infektion erkennbar.

Tab. 3.15: Geschlechts- und Altersverteilung der 24 Patienten mit noch bestehender GBV-C-Virämie und der 9 Patienten mit Serokonversion oder nicht mehr nachweisbarer Virämie

Anzahl Patienten	gesamt	Geschlecht		Geburtsjahr							
		m	w	1903-1912	1913-1922	1923-1932	1933-1942	1943-1952	1953-1962	1963-1972	1973-1982
nicht serokonvertiert	24	14	10	0	2	5	5	6	3	3	0
serokonvertiert	9	4	5	0	1	1	4	0	1	1	1

m = männlich, w = weiblich

Tab. 3.16: Dialysebeginn und Transfusionsstatus der 24 Patienten mit noch bestehender GBV-C-Virämie und der 9 Patienten mit Serokonversion oder nicht mehr nachweisbarer Virämie

Anzahl Patienten	gesamt	Dialysebeginn				Transfusionsstatus		
		vor 1985	1985-1988	1989-1991	1992-1994	keine	1-10	>10
nicht serokonvertiert	24	4	7	6	7	3	9	12
serokonvertiert	9	4	3	0	2	0	3	6

Tab. 3.17: HCV-Befunde [Lendeckel, 2000] der 24 Patienten mit noch bestehender GBV-C-Virämie und der 9 Patienten mit Serokonversion oder nicht mehr nachweisbarer Virämie

Anzahl Patienten	gesamt	HCV-RNA		Anti-HCV	
		+	–	+	–
nicht serokonvertiert	24	9	15	12	12
serokonvertiert	9	4	5	6	3

3.3.2 Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten mit GBV-C-Virämie und E2-Antikörpern (Gruppe II)

Fünf der ursprünglich 12 Patienten aus der Vorstudie von Klingelhöfer mit GBV-C-Virämie und E2-Antikörper konnten nachuntersucht werden. Dabei zeigte sich, daß bei allen fünf Patienten die Virämie verschwunden war, aber Antikörper weiterhin nachweisbar waren (Tab. 3.18).

Tab. 3.18: Ergebnis der Nachuntersuchung bei den fünf Dialysepatienten mit GBV-C-Virämie und GBV-C-E2-Antikörpern aus der Vorstudie

Vorbefund				Nachuntersuchung Anzahl Patienten mit			
Gruppe	RNA	AK	Anzahl	RNA+ AK –	RNA+ AK +	RNA– AK +	RNA– AK –
II	+	+	5	0	0	5	0

RNA = GBV-C-RNA, AK = GBV-C-E2-Antikörper

3.3.3 Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten mit GBV-C-E2-Antikörpern ohne Virämie (Gruppe III)

Bei 99 der 390 Patienten wurden in der Vorstudie E2-Antikörper, aber keine GBV-C-RNA nachgewiesen. Bei fünf dieser Patienten war der Antikörpernachweis fraglich positiv. Für die vorliegende Studie konnten Seren von 47 dieser Patienten beschafft werden, darunter noch vier von Patienten mit fraglich positivem Antikörpernachweis in der Vorstudie.

Von den 47 Patienten hatten 36 Patienten (77 %) weiterhin GBV-C-E2-Antikörper ohne Virämie; bei 11 Patienten (23 %) konnten keine Antikörper mehr nachgewiesen werden. Bei einem dieser Patienten wurde ein fraglich positiver GBV-C-RNA-Befund erhoben (Tab. 3.19).

Tab. 3.19: Ergebnis der Nachuntersuchung bei den 47 Dialysepatienten mit GBV-C-E2-Antikörpern ohne GBV-C-Virämie aus der Vorstudie

Vorbefund				Nachuntersuchung Anzahl Patienten mit			
Gruppe	RNA	AK	Anzahl	RNA+ AK –	RNA+ AK +	RNA– AK +	RNA– AK –
III	–	+	47	1 ^a	0	36 ^b	10 ^c

RNA = GBV-C-RNA, AK = GBV-C-E2-Antikörper; ^a RNA fraglich positiv bei Nachuntersuchung; ^b davon 3 Proben (AK) fraglich positiv bei Vorstudie; ^c davon 1 Probe (AK) fraglich positiv bei Vorstudie

3.3.3.1 Dauer der Nachweisbarkeit von Antikörpern gegen GBV-C-E2

Insgesamt 11 der 47 Patienten haben ihre Antikörper in 2 ½ Jahren verloren. Drei dieser Patienten hatten allerdings in der Vorstudie nur einen fraglich positiven GBV-C-Anti-E2-Befund. Falls es sich dabei um falsch positive Ergebnisse handelt, haben immer noch acht von 44 Patienten ihre Antikörper verloren. Geht man davon aus, daß alle Patienten ihre Antikörper gleichmäßig verlieren, läßt sich daraus eine Verlustrate der Antikörper von 7,3 bis 9,4 % pro Jahr errechnen. Da wir nicht wissen, wie lange die Antikörper schon vor unseren Untersuchungen vorhanden waren, können wir den durchschnittlichen Zeitraum, in dem Antikörper vorhanden sind, auf mindestens fünf bis sieben Jahre nur schätzen.

3.3.3.2 Einflußfaktoren auf die Dauer der E2-Antikörper-Nachweisbarkeit

Ob der Verlust der Antikörper mit bestimmten Merkmalen zusammenhängt, soll der Vergleich der 36 Patienten, die ihre Antikörper behielten, mit den 11 Patienten, bei denen keine Antikörper mehr nachgewiesen wurden, klären (Tab. 3.20-Tab. 3.22). Danach konnte kein Zusammenhang zwischen bestimmten Merkmalen und dem Verlust von Antikörpern festgestellt werden.

Tab. 3.20: Geschlechts- und Altersverteilung der 36 Patienten, bei denen weiterhin GBV-C-E2-Antikörper nachweisbar waren und der 11 Patienten, die ihre Antikörper verloren haben

Anzahl Patienten	gesamt	Geschlecht		Geburtsjahr							
		m	w	1903-1912	1913-1922	1923-1932	1933-1942	1943-1952	1953-1962	1963-1972	1973-1982
AK behalten	36	20	16	1	6	6	10	4	3	5	1
AK verloren	11	4	7	0	1	3	2	1	2	2	0

m = männlich, w = weiblich

Tab. 3.21: Dialysebeginn und Transfusionsstatus der 36 Patienten, bei denen weiterhin GBV-C-E2-Antikörper nachweisbar waren und der 11 Patienten, die ihre Antikörper verloren haben

Anzahl Patienten	gesamt	Dialysebeginn				Transfusionsstatus		
		vor 1985	1985-1988	1989-1991	1992-1994	keine	1-10	>10
AK behalten	36	14	6	6	10	7	12	17
AK verloren	11	4	3	1	3	3	4	4

Tab. 3.22: HCV-Befunde [Lendeckel, 2000] der 36 Patienten, bei denen weiterhin GBV-C-E2-Antikörper nachweisbar waren und der 11 Patienten, die ihre Antikörper verloren haben

Anzahl Patienten	gesamt	HCV-RNA		Anti-HCV	
		+	–	+	–
AK behalten	36	9	27	17	19
AK verloren	11	3	8	8	3

3.3.4 Verlauf von GBV-C-Infektionen bei Dialysepatienten ohne GBV-C-Infektionsmarker (Gruppe IV)

Von den 218 Patienten der Vorstudie ohne GBV-C-Infektionsmarker konnten für die vorliegende Studie 115 nachuntersucht werden. Dabei konnte bei sieben Patienten GBV-C-RNA bei gleichzeitigem Fehlen von GBV-C-E2-Antikörpern nachgewiesen werden (darunter drei GBV-C-RNA fraglich positiv); ein Patient mit positivem GBV-C-RNA-Befund war transplantiert worden.

Eine GBV-C-Virämie mit gleichzeitig positivem Anti-E2-Befund wurde bei einem Patienten festgestellt; bei weiteren fünf Patienten wurden GBV-C-E2-Antikörper ohne Virämie (darunter ein Patient mit fraglich positivem Anti-E2-Befund) festgestellt.

Bei 84 Patienten wurden weiterhin keine Infektionsmarker für GBV-C gefunden. 18 Patienten konnten wegen Materialmangels nicht auf GBV-C-E2-Antikörper untersucht werden, hatten aber einen negativen GBV-C-RNA-Befund (Tab. 3.23).

Tab. 3.23: Ergebnis der Nachuntersuchung bei den 115 Dialysepatienten ohne GBV-C-Infektionsmarker aus der Vorstudie

Vorbefund				Nachuntersuchung Anzahl Patienten mit			
Gruppe	RNA	AK	Anzahl	RNA+ AK –	RNA+ AK +	RNA– AK +	RNA– AK –
IV	–	–	115	7 ^a	1	5 ^b (18 ^c)	84

RNA = GBV-C-RNA, AK = GBV-C-E2-Antikörper; ^a davon 3 Proben (RNA) fraglich positiv; ^b davon 1 Probe (AK) fraglich positiv; ^c bei Nachuntersuchung RNA negativ, auf Antikörper nicht getestet

3.3.4.1 Inzidenz

Von den 115 Patienten ohne GBV-C-Infektionsmarker aus der Vorstudie haben sich mindestens neun, unter Berücksichtigung der fraglichen Befunde sogar 14 Patienten, innerhalb von 2 ½ Jahren mit GBV-C neu infiziert. Von diesen 14 Patienten haben sich sieben Patienten, darunter drei mit fraglichem Befund, neu mit GBV-C infiziert, ohne daß Antikörper nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurde bei einem Patienten eine GBV-C-Virämie mit gleichzeitigem Vorhandensein von Antikörpern festgestellt. Bei fünf neu infizierten Patienten konnten nur noch E2-Antikörper ohne Virämie nachgewiesen werden, darunter einer mit fraglich positivem Befund (Abbildung 3.1). Möglicherweise würde sich diese Zahl noch erhöhen, wenn sich bei den 18 nicht auf Antikörper untersuchten Patienten noch positive GBV-C-Anti-E2-Befunde erheben lassen würden.

Zusätzlich hat sich ein Patient, bei dem schon in der Vorstudie GBV-C-E2-Antikörper nachgewiesen wurden, möglicherweise erneut mit GBV-C infiziert (GBV-C-RNA fraglich positiv). Unter Berücksichtigung von neun bis 14 Neuinfektionen in 2 ½ Jahren läßt sich eine Inzidenz von mindestens 3 bis 5 % errechnen.

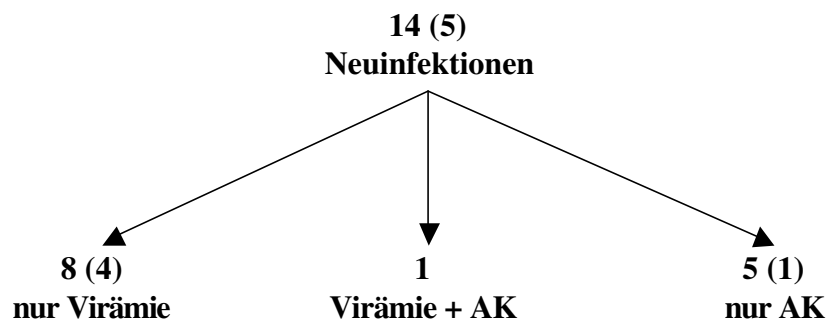


Abb. 3.1: Verteilung der Neuinfektionen

Die Abbildung zeigt, welche GBV-C-Infektionsmarker (einschließlich der fraglich positiven Befunde) bei den Patienten, die sich neu mit GBV-C infiziert haben, nachgewiesen werden konnten. In Klammern ist die Anzahl der fraglichen Befunde angegeben.

3.3.4.2 Einflußfaktoren bei Neuinfektionen

Wir verglichen die 84 Patienten, bei denen weiterhin keine GBV-C-Infektionsmarker festgestellt wurden, mit den Patienten, die sich neu infiziert haben (zum einen die 14 Patienten mit zum Teil fraglich positiven Befunden und zum anderen die neun Patienten ohne fragliche Befunde), bezüglich ihrer Merkmale, um festzustellen, ob es einen Zusammenhang mit Neuinfektionen gibt (Tab. 3.24-Tab. 3.26). Dabei ergab sich kein Hinweis auf einen Faktor, der Einfluß auf eine Neuinfektion haben könnte.

Tab. 3.24: Geschlechts- und Altersverteilung der 84 Patienten, bei denen weiterhin keine Infektionsmarker für GBV-C zu finden waren und der 14 Patienten, die sich neu mit GBV-C infiziert haben

Anzahl Patienten	gesamt	Geschlecht		Geburtsjahr							
		m	w	1903-1912	1913-1922	1923-1932	1933-1942	1943-1952	1953-1962	1963-1972	1973-1982
nicht infiziert	84	45	39	2	8	19	17	14	11	11	2
neu infiziert	14	6	8	0	1	5	5	2	1	0	0

m = männlich, w = weiblich

Tab. 3.25: Dialysebeginn und Transfusionsstatus der 84 Patienten, bei denen weiterhin keine Infektionsmarker für GBV-C zu finden waren und der 14 Patienten, die sich neu mit GBV-C infiziert haben

Anzahl Patienten	gesamt	Dialysebeginn ^a				Transfusionsstatus		
		vor 1985	1985-1988	1989-1991	1992-1994	keine	1-10	>10
nicht infiziert	84 ^a	19	11	22	31	30	30	24
neu infiziert	14	4	2	3	5	2	8	4

^a bei einem Patient ist der Dialysebeginn nicht bekannt

Bei der Prüfung, ob Neuinfektionen mit der Anzahl der Transfusionen zusammenhängen, zeigte sich, daß von 32 Patienten, die keine Transfusionen erhielten, sich zwei Patienten neu infiziert und 30 Patienten nicht infiziert haben. Von den 66 Patienten, die Transfusionen erhielten, haben sich zwölf Patienten neu infiziert und 54 Patienten nicht (Tab. 3.25). Die hier zu beobachtende Tendenz, daß Patienten, die Transfusionen erhielten, sich häufiger neu mit GBV-C infizierten als Patienten, die keine Transfusionen erhielten, ist aber nicht signifikant ($p = 0,0973$, exakter Test nach Fisher).

Tab. 3.26: HCV-Befunde [Dissertation Lendeckel, 2000] der 84 Patienten, bei denen weiterhin keine Infektionsmarker für GBV-C zu finden waren und der 14 Patienten, die sich neu mit GBV-C infiziert haben

Anzahl Patienten	gesamt	HCV-RNA		Anti-HCV	
		+	–	+	–
nicht infiziert	84	16	68	25	59
neu infiziert	14	3	11	6	8

3.3.4.3 Neuinfektionen in den einzelnen Dialysezentren

Die Prävalenz von GBV-C-Infektionsmarkern bei Dialysepatienten lag bei der Vorstudie im Durchschnitt bei 43 %. Die Prävalenz in den einzelnen Dialysezentren variierte sehr stark (zwischen 0 und 100 %). Die Zahlen sind unter Umständen nicht repräsentativ für alle Dialysepatienten, weil die Seren nach bestimmten Kriterien und nicht zufällig ausgewählt wurden und außerdem zum Teil die Anzahl der untersuchten Seren pro Dialysezentrum zu gering war. In Tab. 3.27 werden neben der GBV-C Prävalenz bei der Vorstudie auch die GBV-C Neuinfektionen in den einzelnen Dialysezentren dargestellt. In Klammern ist die Anzahl der Patienten angegeben, die inzwischen transplantiert wurden. Insgesamt haben sich 14 Patienten in 11 Dialysezentren neu infiziert. In diesen Zentren lag die Prävalenz zwischen 25 und 63 %.

Tab. 3.27: Prävalenz von GBV-C aus der Vorstudie und Neuinfektionen in den einzelnen Dialysezentren

Dialysezentrum	Vorstudie			Nachuntersuchung		
	Anzahl Patienten gesamt	GBV-C Positive		Anzahl Patienten gesamt (davon transpl.)	Neuinfektionen	
		n	im Zentrum %		n	im Zentrum %
1. Klinikumsdialyse Gießen	4	4	100	3 (0)	0	0
2. PHV-Dialysezentrum Gießen	35	14	40	16 (0)	2	13
3. KfH-Dialysezentrum Fulda	30	13	43	19 (3)	0	0
4. Klinikumsdialyse Fulda	2	0	0	0 (0)	0	0
5. Dialysezentrum Hannover	11	6	55	5 (0)	0	0
6. PHV-Dialysezentrum Marburg	5	2	40	2 (0)	0	0
7. KfH-Dialysezentrum Bad Orb	8	2	25	2 (0)	0	0
8. KfH-Dialysezentrum Kassel	23	9	39	9 (0)	0	0
10. Klinikumsdialyse Kassel	2	0	0	0 (0)	0	0
11. Klinikumsdialyse Wiesbaden	6	3	50	1 (0)	0	0
12. Humboldt-KH Berlin	5	3	60	0 (0)	0	0
13. St. Joseph-KH Berlin	3	1	33	0 (0)	0	0
14. Klinikumsdialyse Leipzig	11	5	45	5 (0)	1	20
15. Dialysezentrum Fürth	16	5	31	10 (0)	1	10
16. KfH-Dialysezentrum Berlin	19	8	42	8 (0)	0	0
17. KfH-Dialysezentrum Berlin	47	17	36	27 (2)	3	11
18. Krankenanstalten Gilead Bielefeld	3	2	67	3 (0)	0	0

Dialysezentrum	Vorstudie			Nachuntersuchung		
	Anzahl Patienten gesamt	GBV-C Positive		Anzahl Patienten gesamt (davon transpl.)	Neuinfektionen	
		n	im Zentrum %		n	im Zentrum %
19. PHV-Dialysezentrum Singen	1	1	100	0 (0)	0	0
20. Klinikumsdialyse Nürnberg	6	3	50	2 (0)	0	0
21. PHV-Dialysezentrum Jever	9	4	44	3 (0)	0	0
22. PHV-Dialysezentr. Gelsenkirchen	4	2	50	0 (0)	0	0
23. PHV-Dialysezentrum Wetzlar	9	3	33	4 (0)	0	0
24. PHV-Dialysezentrum Sindelfingen	2	0	0	2 (0)	0	0
25. PHV-Dialysezentrum Bielefeld	15	5	33	9 (0)	1	11
26. KfH-Dialysezentrum Rostock	7	2	29	4 (0)	1	25
27. PHV-Dialysezentrum Paderborn	1	0	0	0 (0)	0	0
28. Dialysezentrum Flensburg	8	4	50	7 (2)	1	14
29. PHV-Dialysezentrum Stuttgart	1	0	0	1 (0)	0	0
30. PHV-Dialysezentrum Herford	8	2	25	8 (0)	1	13
31. KfH-Dialysezentrum Leipzig	8	5	63	5 (0)	1	20
32. PHV-Dialysezentrum Stuttgart	8	3	38	3 (0)	0	0
33. PHV-Dialysezentrum Dresden	13	10	77	5 (0)	0	0
34. PHV-Dialysezentrum Detmold	3	1	33	2 (0)	1	50
35. Nephrologe Dr. Kuhnert	11	7	64	5 (1)	0	0
36. PHV-Dialysezentrum Betzdorf	2	2	100	2 (0)	0	0
37. PHV-Dialysezentr. Bad Harzburg	2	1	50	1 (1)	0	0
38. PHV-Dialysezentrum Reutlingen	3	1	33	2 (0)	1	50
39. PHV-Dialysezentrum Waiblingen	1	1	100	1 (0)	0	0
40. PHV-Dialysezentrum Biberach	1	1	100	0 (0)	0	0
41. PHV-Dialysezentrum Backnang	2	2	100	1 (0)	0	0
42. PHV-Dialysezentrum Salzgitter	2	1	50	1 (0)	0	0
43. PHV-Dialysezentr. Bad Homburg	7	1	14	3 (0)	0	0
44. Dialysezentrum Erfurt	2	1	50	2 (0)	0	0
45. Dialysezentrum Borna	2	0	0	2 (0)	0	0
46. PHV-Dialysezentrum Wernigerode	6	3	50	3 (0)	0	0
47. KH Friedrichshain, Berlin	5	3	60	4 (0)	0	0
48. KfH-Dialysezentrum Erfurt	7	1	14	6 (1)	0	0
49. Kliniken Minden	1	1	100	0 (0)	0	0
50. PHV-Dialysezentrum Minden	1	0	0	1 (1)	0	0
51. Dialysestation Charité, Berlin	2	2	100	1 (1)	0	0
gesamt	390	167	43	200 (12)	14	7

3.3.5 Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse dieser Studie

Eine abschließende Übersicht der Ergebnisse der Nachuntersuchung, bezogen auf die Ergebnisse der Vorstudie gibt Tab. 3.28 und Abb. 3.2. Die Gruppeneinteilung erfolgte nach der Befundkombination der Patienten für GBV-C aus der Vorstudie [Dissertation Klingelhöfer, 1998]. Nähere Erläuterungen siehe Kapitel 3.3.1 bis 3.3.4.

Tab. 3.28: GBV-C-Befunde der Nachuntersuchung bezogen auf die Vorbefunde

Vorbefund				Nachuntersuchung Anzahl Patienten mit			
Gruppe	RNA	AK	Anzahl	RNA+ AK –	RNA+ AK +	RNA– AK +	RNA– AK –
I	+	–	33	24	1 ^a	5	3
II	+	+	5	0	0	5	0
III	–	+	47	1 ^b	0	36	10 ^c
IV	–	–	115	7 ^d	1	5 ^e (18 ^f)	84
gesamt			200	32	2	51 (18)	97

^a AK fraglich positiv bei Nachuntersuchung, ^b RNA fraglich positiv bei Nachuntersuchung, ^c davon 3 Proben (AK) fraglich positiv bei Vorstudie, ^d davon 3 Proben (RNA) fraglich positiv bei Nachuntersuchung, ^e davon 1 Probe (AK) fraglich positiv bei Nachuntersuchung, ^f bei Nachuntersuchung RNA negativ, auf Antikörper nicht getestet

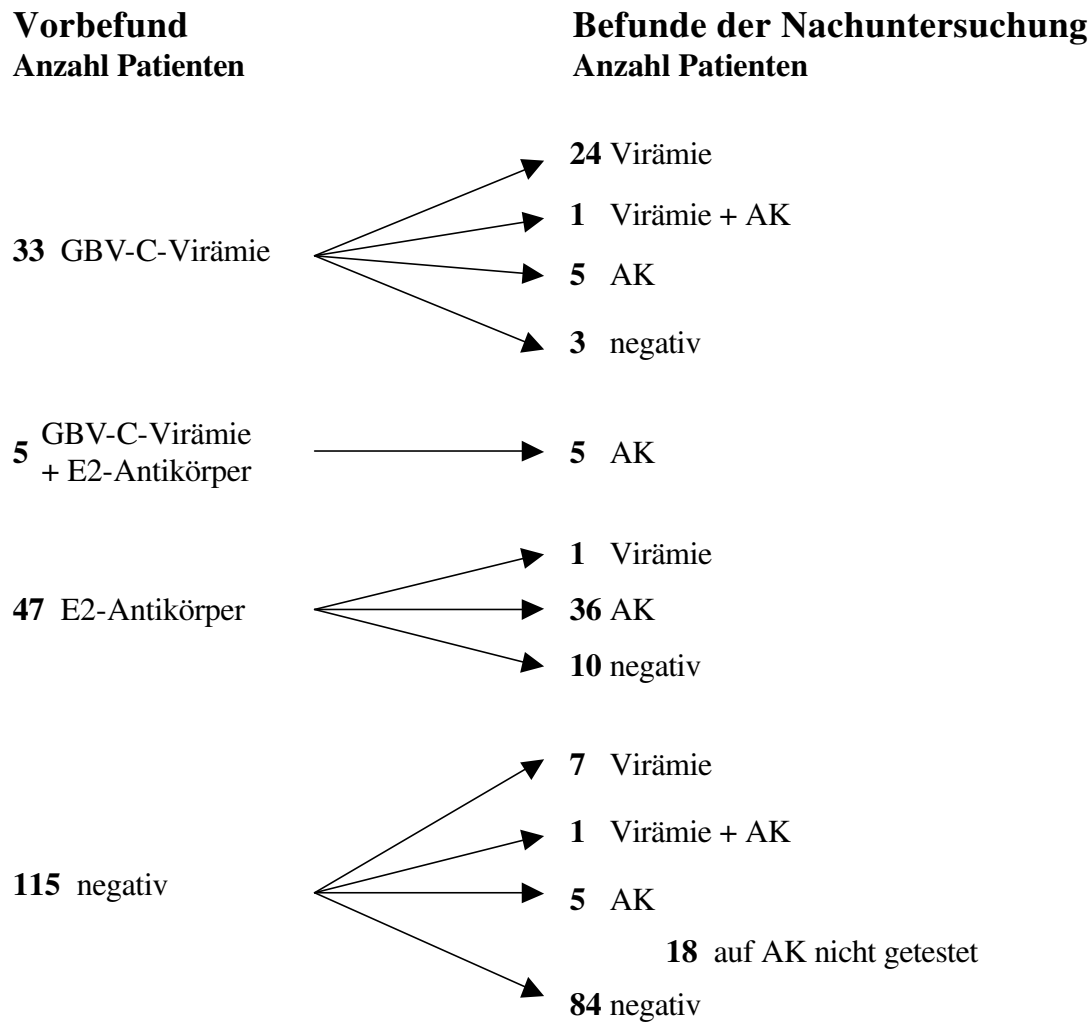


Abb. 3.2: Übersicht über die GBV-C-Infektionsverläufe

Die Abbildung zeigt den Infektionsverlauf der Patienten mit einer bestimmten Befundkombination aus der Vorstudie. E2-Antikörper = GBV-C-E2-Antikörper, Virämie = GBV-C-RNA positiv oder fraglich positiv in der Nachuntersuchung, AK = GBV-C-E2-Antikörper positiv oder fraglich positiv in der Nachuntersuchung.

4 Diskussion

4.1 Untersuchtes Kollektiv

Von 390 Dialysepatienten in der Studie von Klingelhöfer konnten nach 2½ Jahren noch 200 Patienten nachuntersucht werden. Von den restlichen 190 Patienten waren 130 Patienten verstorben. Die hohe Sterberate von über 30 % in 2 ½ Jahren läßt sich durch die Altersstruktur und die Multimorbidität des Kollektivs erklären. In bezug auf Geschlecht, Transfusionshäufigkeit, Dialysedauer und Infektionsstatus (HCV und GBV-C) ergab sich kein Hinweis auf eine Selektion. Insgesamt läßt sich sagen, daß das Kollektiv der Nachuntersuchung repräsentativ für die der Vorstudie ist und mit 200 Patienten sehr umfangreich ist.

Bisherige Studien konnten zeigen, daß der Nachweis von GBV-C-RNA als eine bestehende Infektion zu werten ist. GBV-C-RNA und GBV-C-E2-Antikörper kommen selten gemeinsam vor. Daher stellt dieser Zustand eine Übergangsphase dar. Das Auftauchen von GBV-C-E2-Antikörpern ist meist mit dem Verlust der Virämie verbunden. Der Nachweis von GBV-C-E2-Antikörpern zeigt demnach eine frühere, überstandene GBV-C-Infektion an [Hwang et al., 1999; Stark et al., 1999; Tanaka et al., 1998; Thomas et al., 1998, Hassoba et al., 1997; Tacke et al., 1997; Pilot-Matias et al., 1996]. Dementsprechend teilten wir unser Patientenkollektiv in Patienten mit GBV-C-Virämie ohne Antikörper, Patienten mit GBV-C-Virämie und Antikörpern, Patienten mit GBV-C-E2-Antikörpern, aber ohne Virämie und Patienten ohne GBV-C-Infektionsmarkern ein.

In der Vorstudie zeigten 85 der 200 Patienten GBV-C-Infektionsmarker und 115 Patienten keine. Von den 85 Patienten mit Infektionsmarkern hatten 33 Patienten GBV-C-RNA ohne E2-Antikörper, fünf Patienten eine GBV-C-Virämie mit gleichzeitigem Vorhandensein von E2-Antikörpern, und 47 Patienten wiesen nach überstandener GBV-C-Infektion nur noch E2-Antikörper auf.

4.2 Nachuntersuchung bei Patienten mit GBV-C-Virämie ohne E2-Antikörper

Acht der 33 Patienten mit einer GBV-C-Virämie, jedoch ohne GBV-C-E2-Antikörper in der Vorstudie vor 2 ½ Jahren haben ihre Virämie verloren. Bei fünf dieser acht Patienten waren jetzt GBV-C-E2-Antikörper nachweisbar, während bei drei Patienten keine Antikörper nachweisbar waren. Dies zeigt, daß eine GBV-C-Virämie verschwinden kann. 25 Patienten waren weiterhin virämisch. Von diesen 25 Patienten konnte bei keinem gleichzeitig E2-Antikörper sicher nachgewiesen werden, bei einem Patienten ergab sich ein grenzwertiger Anti-E2 Befund.

Hier stießen wir auf die Grenzen des Antikörpertests. Oft ließen sich positive und negative Proben nicht klar voneinander abgrenzen. Die Extinktionswerte dieser Proben lagen im Bereich von $\pm 10 \%$ um den Cut-off und ließen sich auch durch Nachuntersuchungen nicht eindeutig als positiv oder negativ einordnen. Zum einen könnte dies auf eine Schwäche des verwendeten Antikörpertests hinweisen, zum anderen ist es jedoch nicht verwunderlich, wenn bei Patienten mit geringem Antikörpertiter Extinktionswerte um den Cut-off liegen. Zu einem geringen Antikörpertiter kann es kommen, wenn Patienten gerade erst Antikörper entwickeln oder schon wieder verlieren. Der eine Patient mit GBV-C-Virämie in der Vorstudie und fraglich positivem Anti-E2-Befund in der Nachuntersuchung könnte zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung gerade erst begonnen haben, GBV-C-E2-Antikörper zu entwickeln, so daß diese gerade an der Nachweisgrenze lagen.

Die Überprüfung der GBV-C-RNA-Vorbefunde der drei Patienten, die ihre Virämie verloren haben und in der Nachuntersuchung Anti-E2 negativ waren, ergab, daß bei zwei Patienten GBV-C-RNA sicher nachgewiesen wurde, da die positiven Ergebnisse mit mindestens zwei verschiedenen Primerpaaren erzielt worden waren. Dagegen fiel bei einem Patienten nur ein Test positiv aus. Möglicherweise könnte es sich hier um ein falsch positives Ergebnis handeln. Damit haben aber noch mindestens zwei Patienten ihre Virämie verloren, ohne daß in der Nachuntersuchung Antikörper nachzuweisen waren. Da unsere weiteren Ergebnisse in Übereinstimmung mit anderen Studien für einen Infektionsverlauf sprechen, der von der Virämie über Virämie plus Antikörper zum Verlust der Virämie und letztendlich zum Verschwinden der Antikörper führt, halten wir es für möglich, daß die zwei Patienten erst Antikörper entwickelten, anschließend ihre Virämie verloren und letztendlich die Antikörper bis zu unserer Untersuchung auch schon wieder verloren haben.

4.2.1 Durchschnittliche Dauer der Virämie

Acht von 33 Patienten (24 %) haben ihre Virämie in 2 ½ Jahren verloren. Nimmt man an, daß alle Patienten ihre GBV-C-Virämie gleichmäßig verlieren, würden 9,7 % der Infizierten ihre Virämie pro Jahr verlieren. Daraus resultiert eine durchschnittliche Virämiedauer von fünf Jahren nach Diagnosestellung. Da wir aber nicht den Infektionszeitpunkt kennen, können wir die mittlere Virämiedauer auf mindestens fünf Jahre nur schätzen.

Aus der Gruppe der Patienten ohne GBV-C-Infektionsmarker in der Vorstudie wurde bei vier Patienten ein positiver Anti-E2-Befund und bei einem weiteren Patienten ein fraglich positiver Anti-E2-Befund jeweils ohne Virämie festgestellt. Bei acht Patienten war dagegen eine Virämie nachweisbar. Ausgehend davon, daß der Nachweis von E2-Antikörpern als zurückliegende Infektion gilt, haben die fünf Patienten mit positivem Anti-E2-Befund sich in den 2 ½ Jahren neu mit GBV-C infiziert und ihre Virämie schon wieder verloren. Eine relativ kurze Virämiedauer unter zwei Jahren ist also nicht selten.

In einer Studie mit 251 Kindern, die in den ersten vier Wochen ihres Lebens Bluttransfusionen erhielten, waren im Durchschnitt 37 Monate nach letzter Transfusion 19 Kinder GBV-C-RNA positiv. Eine Nachuntersuchung konnte bei 14 Kindern 12 bis 17 Jahre nach der letzten Transfusion durchgeführt werden. Dabei wurde nicht nur GBV-C-RNA nachgewiesen, sondern auch durch Sequenzierung einzelner Genomabschnitte von GBV-C die Isolate miteinander verglichen. So wurde bei vier Patienten eine persistierende Infektion festgestellt und ausgeschlossen, daß diese sich nur zwischenzeitlich neu infiziert haben. Alle vier Kinder waren gesund und ohne klinische Anzeichen einer Lebererkrankung. Auch die Leberfunktionstests zeigten keine Abweichungen. Die restlichen 10 Patienten haben ihre Virämie verloren [Wölfle et al., 1998]. In dieser Studie zeigten einzelne Patienten eine etwas, aber nicht wesentlich längere Virämiedauer als die von uns geschätzte Virämiedauer. Ein Infektionszeitpunkt kurz nach Geburt führt erfahrungsgemäß oft zu Persistenz, wie z.B. die HBV-Infektion zeigt.

Bei der Untersuchung von 120 Dialysepatienten aus einem französischen Dialysezentrum waren von 17 Patienten mit GBV-C-Virämie nach 18-78 Monaten noch 16 virämisch, während nur einer die Virämie verloren hatte [Desassis et al., 1999].

Bei einer Nachuntersuchung von 150 Thalassämiepatienten zeigten zu Beginn der Studie 22 Patienten eine GBV-C-Virämie und 28 Patienten GBV-C-E2-Antikörper. Auch hier verloren nur sechs von 22 Patienten ihre Virämie in sechs Jahren, wovon vier E2-Antikörper entwickelten [Prati et al., 1998]. Beide Studien zeigen in Übereinstimmung zu unserer Studie einen chronischen Verlauf von GBV-C-Infektionen an, aber es verloren weniger Patienten pro Jahr ihre Virämie (1,5 % und 4,5 %) als in unserer Studie (9,7 %).

Ob eine Virämie länger andauert oder ob rasch E2-Antikörper gebildet werden, die den Verlust der Virämie einleiten (siehe S.71), scheint von der Immunlage abhängig zu sein. Das zeigt das Verhältnis von GBV-C-RNA-positiven zu Anti-E2-positiven Patienten verschiedener, repräsentativer Gruppen (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Verhältnis GBV-C-RNA zu E2-Antikörpern bei Personen verschiedener Gruppen mit positivem GBV-C-Befund

	positiver GBV-C-RNA-Befund	positiver Anti-E2-Befund	RNA:AK
Blutspender [Sauleda et al., 1999a], [Tacke et al., 1997]	1,9 %	16 %	1:8,4
Dialysepatienten [Dessasis et al., 1999]	14,2 %	15,0 %	1:1,1
Thalassämiepatienten [Prati et al., 1998]	14,5 %	18,5 %	1:1,3
Hämophiliepatienten [De Filippi et al., 1997]	8,1 %	28,6 %	1:3,5
HCV Positive [Sauleda et al., 1999b]	28,4 %	43,1 %	1:1,5
i.v.-Drogenabhängige (Thomas et al., 1998)	33,6 %	69,8 %	1:2,1

Bei immun geschwächten Personen, zu denen auch die Dialysepatienten zählen, ist der Antikörperanteil (Verhältnis der RNA-positiven Patienten zu den AK-positiven Patienten = 1:1,1) wesentlich geringer als z.B. bei Blutspendern mit 1:8,4. Zu persistierenden GBV-C-Infektionen kommt es also vermehrt bei immun geschwächten Personen. Daß der Antikörperanteil bei Hämophiliepatienten höher ist als bei Dialysepatienten, könnte möglicherweise an einer Übertragung von schützenden Antikörpern gegen GBV-C mit den Plasmakonzentraten liegen.

4.3 Nachuntersuchung bei Patienten mit GBV-C-Virämie und E2-Antikörpern

Alle fünf Patienten aus der Vorstudie, die eine Virämie und gleichzeitig Antikörper hatten, haben ihre Virämie verloren. Das Auftreten von GBV-C-E2-Antikörpern scheint immer den Verlust der Virämie einzuleiten.

Auch eine andere Follow-up Studie von GBV-C-Infektionen bei 180 homosexuellen Männern (mittlerer Untersuchungsabstand von sieben Jahren) konnte bestätigen, daß mit dem Auftauchen von E2-Antikörpern immer der Verlust der GBV-C-Virämie assoziiert war [Stark et al., 1999].

In einer weiteren Studie über die Rolle von GBV-C-E2-Antikörpern bei Patienten mit akuter Posttransfusionshepatitis haben von 10 Patienten mit positivem GBV-C-RNA-Befund vor der Transfusion drei Patienten ihre Virämie 2, 10 und 28 Monate nach der Transfusion verloren und GBV-C-E2-Antikörper entwickelt. Bei den anderen sieben Patienten war weiterhin GBV-C-RNA nachweisbar, aber keine E2-Antikörper [Hwang et al., 1999]. In dieser Studie wird von Patienten berichtet, bei denen erst nach Verschwinden der Virämie E2-Antikörper nachweisbar waren. Unsere Ergebnisse sprechen dagegen für eine zeitliche Abfolge Virämie, Virämie plus Antikörper, Verlust der Virämie und Verschwinden der Antikörper. Möglicherweise ist in der Studie von Hwang und Mitarbeitern die Sensitivität des Antikörpertests zu gering, so daß erst verspätet Antikörper nachgewiesen wurden. Oder zum Zeitpunkt des positiven Antikörpernachweises war die Sensitivität der PCR zu gering, so daß GBV-C-RNA zwar vorhanden war, aber nicht nachgewiesen werden konnte.

Bei einer Untersuchung von 116 i.v.-Drogenabhängigen, die im Durchschnitt viermal über 6 ½ Jahre hinweg auf GBV-C-RNA und E2-Antikörper untersucht wurden, haben acht Teilnehmer ihre Virämie verloren und dabei E2-Antikörper entwickelt. Im Vergleich dazu haben von 32 weiterhin virämischen Teilnehmern nur drei

E2-Antikörper entwickelt [Thomas et al., 1998]. Diese drei Teilnehmer könnten sich in dem Übergangsstadium befinden, in dem sie mit der Bildung von E2-Antikörpern ihre Virämie verlieren.

In einer Studie bei Patienten mit transfusionsassoziiierter Non-A-Non-B-Hepatitis haben sieben von 12 Patienten mit GBV-C-Virämie nach mehr als einem Jahr E2-Antikörper entwickelt und ihre Virämie verloren. Im Gegensatz dazu waren die anderen fünf Patienten weiterhin virämisch und GBV-C-Anti-E2 negativ [Tanaka et al., 1998].

Von 23 Patienten, die GBV-C-kontaminierte Blutprodukte empfangen hatten, waren 15 (65 %) Patienten danach GBV-C-RNA positiv, während sieben Anti-E2 positive Patienten nicht virämisch waren. Ein Patient war GBV-C-RNA und Anti-E2 negativ. Persistierende GBV-C-Infektionen wurden speziell bei Patienten mit extrem schlechten Blutwerten oder bei Patienten, die einer immunsuppressiven Behandlung unterzogen wurden, beobachtet [Heuft et al., 1998].

Aus einer Gruppe von 16 Patienten mit Posttransfusions-Hepatitis, die nach 16 Jahren nachuntersucht werden konnten, haben diejenigen ihre Virämie verloren, die E2-Antikörper entwickelten. Die Patienten, die keine E2-Antikörper aufwiesen, blieben virämisch [Tacke et al., 1997].

Damit konnten wir parallel zu allen bisher veröffentlichten Studien bestätigen, daß mit der Bildung von GBV-C-E2-Antikörpern normalerweise der Verlust der Virämie assoziiert ist.

Auch scheint der zeitliche Rahmen, in dem GBV-C-RNA und E2-Antikörper gemeinsam vorkommen, relativ kurz zu sein. Alle fünf Patienten mit GBV-C-Virämie und gleichzeitigem positivem E2-Antikörper-Befund aus der Vorstudie haben ihre Virämie innerhalb von 2 ½ Jahren verloren und nur noch E2-Antikörper waren nachweisbar. Nur bei einem Patienten, der vorher GBV-RNA positiv und Anti-E2 negativ war, und bei einem weiteren Patienten, der vorher keine GBV-C-Infektionsmarker aufwies, waren gleichzeitig GBV-C-RNA und Antikörper nachweisbar. Insgesamt konnten also in unserer Studie nur bei zwei von 200 Patienten GBV-C-RNA und E2-Antikörper gleichzeitig nachgewiesen werden. GBV-C-RNA und E2-Antikörper kommen also gemeinsam nur kurze Zeit vor.

Eine negative Korrelation von GBV-C-RNA und E2-Antikörpern wurde auch in früheren Studien festgestellt [Thomas et al., 1998, siehe auch S. 62; Hassoba et al., 1997; Tacke et al., 1997; Pilot-Matias et al., 1996].

4.4 Nachuntersuchung bei Patienten mit GBV-C-E2-Antikörpern, aber ohne Virämie

Bei insgesamt 47 Patienten wurden in der Vorstudie GBV-C-E2-Antikörper, aber keine GBV-C-Virämie festgestellt. Von diesen 47 Patienten hatten nur noch 36 weiterhin GBV-C-E2-Antikörper, während elf Patienten (23 %) ihre Antikörper verloren haben. Von diesen elf Patienten wies einer in der Nachuntersuchung einen GBV-C-RNA fraglich positiven Befund auf.

GBV-C-RNA fraglich positive Befunde wurden insgesamt bei vier Proben erhoben. Jedesmal war die erste Untersuchung positiv und zwei weitere negativ. Da die Empfindlichkeit der Testdurchläufe in der ersten Untersuchung höher als in den beiden anderen war, halten wir es für möglich, daß alle Proben zwar nur wenig Virusmaterial enthalten, aber schwach positiv sind. Wir bewerteten daher diese Proben als GBV-C-RNA fraglich positiv (siehe auch S. 47).

Bei der Frage, ob GBV-C-E2-Antikörper vor einer Reinfektion schützen, stellten wir fest, daß von 47 Patienten mit E2-Antikörpern in der Vorstudie sich nur ein Patient möglicherweise erneut mit GBV-C (GBV-C-RNA fraglich positiv) infiziert hat. Bei diesem einen Patienten wurden in der Nachuntersuchung keine E2-Antikörper mehr nachgewiesen. Der Anti-E2-Befund in der Vorstudie war nur schwach positiv. Möglicherweise befand sich dieser eine Patient in dem Zustand, in dem er seine Antikörper gerade verlor, so daß er zum Zeitpunkt seiner Reinfektion schon keine Antikörper mehr hatte. Damit hätte sich dann kein Patient mit GBV-C-E2-Antikörpern erneut mit GBV-C infiziert.

Im Gegensatz dazu haben sich von 115 Patienten ohne GBV-C-Infektionsmarker in der Vorstudie, also ohne Antikörperschutz, mindestens neun Patienten mit GBV-C infiziert (siehe auch S. 75). Es ist es also wahrscheinlich, daß GBV-C-E2-Antikörper vor einer GBV-C-Reinfektion schützen oder zumindest ihre Präsenz Schutz anzeigt.

In Übereinstimmung zu unserer Studie konnten Tillmann und Mitarbeiter [1998] bei einer Untersuchung auf GBV-C-Infektionsmarker von 117 Patienten vor und nach einer Lebertransplantation feststellen, daß bei 38 Patienten, die vor der Transplantation GBV-C-E2-Antikörper hatten, nach der Transplantation keiner GBV-C-RNA positiv wurde. Im Vergleich dazu waren 30 von 65 Patienten (46,2 %), die vorher keine GBV-C-Infektionsmarker hatten, nach der Transplantation GBV-C-RNA positiv. Daraus leiteten sie ab, daß E2-Antikörper vor GBV-C-Reinfektionen schützen könnten.

Auch hier zeigt zumindest die Präsenz von E2-Antikörpern einen Schutz vor Reinfektionen und zwar auch bei Immunsupprimierten an.

Auch in der Studie von Thomas und Mitarbeitern [1998] (siehe auch S. 71) wurde kein Teilnehmer, der nach E2-Antikörperbildung seine Virämie verloren hatte, erneut GBV-C-RNA positiv. Daraus leiteten sie ab, daß GBV-C-E2-Antikörper nicht nur mit dem Verlust der Virämie, sondern auch mit einem Schutz vor Reinfektion assoziiert ist.

Im Gegensatz dazu waren in einer anderen Studie über GBV-C-Infektionsmarker bei 34 Kindern vor und nach einer Lebertransplantation von neun Kindern, die vor der Transplantation Anti-E2 positiv waren, drei Kinder nach der Transplantation GBV-C-RNA positiv. Hier konnte ein kompletter Schutz vor GBV-C-Reinfektionen durch E2-Antikörper nicht bestätigt werden [Elkayam et al., 1999]. Möglicherweise ist der Schutz vor GBV-C-Reinfektionen durch E2-Antikörper abhängig vom Geno- oder Serotyp von GBV-C. Dies könnten weitere Untersuchungen mit Bestimmung der Geno-/Serotypen von GBV-C bei Reinfektionen trotz Vorhandensein von E2-Antikörpern abklären. Außerdem könnte der Schutz vor Reinfektionen durch eine Immunsuppression bei Transplantationen doch beeinträchtigt sein.

Elf von 47 Patienten haben ihre Antikörper verloren. Wenn alle Patienten ihre Antikörper gleichmäßig verlieren würden, würden 9,4 % der Antikörperträger ihre Antikörper pro Jahr verlieren. Da wir nicht wissen, wie lange die Antikörper schon vorhanden waren, können wir die durchschnittliche Dauer der Nachweisbarkeit von E2-Antikörpern auf mindestens fünf Jahre nur schätzen.

Stark und Mitarbeiter stellten in ihrer Studie bei homosexuellen Männern (siehe auch S. 71) einen geringeren Verlust von Antikörpern mit einer Rate von nur 1,5 % pro Jahr fest [Stark et al., 1999].

In der Studie von Prati und Mitarbeitern [1998] mit Thalassämiepatienten (siehe auch S. 70) haben 12 von 28 Patienten innerhalb von sechs Jahren ihre E2-Antikörper verloren. Die hier festgestellte Rate von 7,1 %, mit der Anti-E2 positive Patienten ihre Antikörper pro Jahr verlieren, ist der in unserer Studie festgestellten Rate von 9,4 % ähnlich.

Möglicherweise verlieren immun geschwächte Personen, zu denen in der Regel sowohl Dialysepatienten als auch Thalassämiepatienten zählen, schneller ihre Antikörper als andere, wie z.B. homosexuelle Männer in der Studie von Stark und Mitarbeitern [1999].

Weiterhin konnten bisher auch noch nach 14 Jahren E2-Antikörper nachgewiesen werden [Tacke et al., 1997]

Die Antikörper persistieren also in der Regel nicht lebenslang, aber ob im einzelnen nicht doch eine lebenslange Immunität besteht, kann nicht ausgeschlossen werden.

4.5 Typischer Verlauf der GBV-C-Infektion

In unserer Studie konnten wir bestätigen, daß eine GBV-C-Virämie verschwinden kann. Wir schätzen die durchschnittliche Virämiedauer auf über fünf Jahre, jedoch können sowohl kürzere als auch wesentlich längere Infektionen vorkommen. Meist ist die Virämiedauer allerdings begrenzt. Mit der GBV-C-E2-Antikörperbildung kommt es normalerweise zum Verlust der Virämie. GBV-C-RNA und E2-Antikörper kommen nur kurz gemeinsam vor, so daß dieser Zustand nur eine Übergangsphase darstellt.

Auch wir kamen zu dem Schluß, daß der Nachweis von GBV-C-E2-Antikörpern als Merkmal einer überstandenen GBV-C-Infektion zu werten ist.

Weiterhin halten wir es für möglich, daß GBV-C-E2-Antikörper einen Schutz vor Reinfektionen bieten. Jedoch persistieren die E2-Antikörper wahrscheinlich nicht lebenslang. Wir schätzen die mittlere Nachweisbarkeit der Antikörper auf über fünf Jahre.

4.6 Neuinfektionen

Insgesamt haben sich mindestens neun Patienten neu mit GBV-C infiziert. Davon haben vier Patienten eine bestehende GBV-C-Infektion mit Virämie, ein Patient befindet sich in der Übergangsphase der Virämie mit gleichzeitigem Vorhandensein von E2-Antikörpern und vier Patienten wiesen als überstandene Infektion nur noch Antikörper auf.

Weiterhin haben wir bei einem Patienten ohne GBV-C-Infektionsmarker einen fraglich positiven GBV-C-Anti-E2-Befund festgestellt (siehe auch S. 69).

Zusätzlich erhoben wir bei einem Patienten, der vorher GBV-C-E2-Antikörper hatte, und bei drei weiteren Patienten ohne GBV-C-Infektionsmarkern fraglich positive GBV-C-RNA-Befunde (siehe auch S. 73).

Insgesamt haben sich also mindestens neun (14 bei Berücksichtigung der fraglich positiven Befunde) Patienten in 2 ½ Jahren mit GBV-C neu infiziert. Darunter haben

vier (acht bei Berücksichtigung der fraglich positiven Befunde) Patienten eine Virämie ohne Antikörper, ein Patient eine Virämie mit Antikörper und vier (fünf bei Berücksichtigung der fraglich positiven Befunde) Patienten nur noch Antikörper ohne Virämie. Daraus resultiert eine Inzidenz von mindestens 3 % (5 % bei Berücksichtigung der fraglich positiven Befunde).

In der Studie von Prati und Mitarbeitern [1998] (siehe auch S. 70) haben sich von 100 Thalassämiepatienten ohne GBV-C-Infektionsmarker innerhalb von sechs Jahren 10 Patienten neu mit GBV-C infiziert: darunter zwei GBV-C-RNA positiv, einer GBV-C-RNA und Anti-E2 positiv und sieben nur Anti-E2 positiv. In dieser Studie ergab sich im Vergleich zu unserer Studie eine geringere Inzidenz von nur 1,7 %. Hier ist der längere Untersuchungsabstand von sechs Jahren zu berücksichtigen. Möglicherweise haben sich in dieser Zeit Patienten neu mit GBV-C infiziert, aber ihre Virämie sowie die Antikörper schon wieder verloren.

Bei der Untersuchung von schottischen Blutspendern ergab sich eine Inzidenz von 1,7-2 % [Blair et al., 1998]. Hier ist die geringere Inzidenz wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß Blutspender prinzipiell ein geringeres Risiko für parenteral übertragbare Viren haben.

4.6.1 Übertragungswege

Mit der in unserer Studie festgestellten, sehr hohen Inzidenz von 3 bis 5 % stellt sich die Frage nach dem Übertragungsweg.

Bei einem neu infizierten Patienten, der in der Zwischenzeit transplantiert worden ist, ist der parenterale Übertragungsweg durch die Transplantation möglich. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß Organtransplantationen das Infektionsrisiko für parenteral übertragbare Viren erhöhen. Bei einer Untersuchung im Rahmen von Lebertransplantationen stieg die Anzahl der GBV-C-RNA-positiven Patienten von 16 % vor Transplantation auf 38 % nach der Transplantation [Belli et al., 1996], bzw. von 9 % auf 20 % [Berg et al., 1996]. Fried und Mitarbeiter [1997] konnten in ihrer Studie zeigen, daß sich 7,4 % im Rahmen einer Transplantation neu mit GBV-C infiziert haben. In einer weiteren Studie haben sich sieben von 82 Patienten nach einer Nierentransplantation neu mit GBV-C-RNA infiziert [Isaacson et al., 1999].

Vor Einführung von synthetischem Erythropoeitin war eine hohe Inzidenz bei Dialysepatienten durch eine parenterale Übertragung aufgrund der Notwendigkeit von Transfusionen bei Dialysepatienten zu erklären.

Prinzipiell deutet eine Inzidenz von GBV-C mit 1,7-2 % [Blair et al., 1998], bzw. eine Prävalenz mit 1-5 % bei Blutspendern auf noch weitere Übertragungswege als nur den parenteralen hin.

Jedoch läßt die in dieser Studie festgestellte höhere Inzidenz bei Dialysepatienten, aber auch die deutlich höhere Prävalenz mit 49,3 % bei nicht transfundierten Dialysepatienten [Dissertation Klingelhöfer, 1998] vermuten, daß es noch immer zu Infektionen mit GBV-C im Dialysezentrum kommt. Möglicher Übertragungsweg wäre die nosokomiale Infektion aufgrund mangelnder Hygiene entweder während der Dialysebehandlung oder bei anderen medizinischen Maßnahmen.

Da inzwischen die Inzidenz von HCV bei Dialysepatienten in Deutschland mit max. 0,8 % seit 1992 stark zurückgegangen ist [Lendeckel, 2000], stellt sich die Frage, warum die Inzidenz von GBV-C immer noch so hoch ist. Möglicherweise führt der positive HCV-Befund, der dem Personal des Dialysezentrums bekannt ist, zu einem vorsichtigeren Umgang mit den betreffenden Patienten. Dies würde andererseits bedeuten, daß der normale Umgang mit Patienten, von denen keine Infektionen bekannt sind, nicht vorsichtig genug ist, so daß es immer noch zu Übertragung von Viren, wie GBV-C, kommen kann.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Frage, ob medizinisches Personal bei der Betreuung von Dialysepatienten oder Nierentransplantierten ein erhöhtes Risiko einer GBV-C-Infektion hat. Dazu wurde die Prävalenz von GBV-C (RNA und E2-Antikörper) von 49 Personen des medizinischen Personals mit der von 85 Dialysepatienten und der von 86 Nierentransplantierten verglichen. Als Kontrollgruppe dienten 64 Blutspender. Im medizinischen Personal zeigte sich mit 24 % eine hohe Prävalenz von GBV-C, die der Prävalenz von Dialysepatienten mit 25 % und der von Nierentransplantierten mit 36 %, aber nicht zur Kontrollgruppe mit 9 % ähnlich ist. Im Gegensatz dazu war die Prävalenz von HCV, als Marker einer parenteralen Infektion, im medizinischen Personal mit 2 % und bei der Kontrollgruppe mit 0 % gering, aber bei Dialysepatienten mit 13 % und bei Nierentransplantierten mit 13 % hoch. Also konnte hier ein berufliches Risiko einer GBV-C-Infektion bei medizinischem Personal von Dialysepatienten und Nierentransplantierten dokumentiert werden, mit der Vermutung, daß es weitere Übertragungswege als nur den parenteralen gibt [Gärtner et al., 1999]. In Übereinstimmung zu unserer Studie wird hier eine Übertragung von GBV-C in Dialysezentren vermutet. Auch hier zeigte sich, daß die Gefahr einer Übertragung von HCV im Gegensatz zu GBV-C zurückgegangen ist. Jedoch vermuten wir den Grund dafür in der Tatsache, daß es durch den bekannten

positiven HCV-Befund zu einem vorsichtigeren Umgang mit den betreffenden Patienten kommt und damit die Gefahr der Übertragung verringert wird.

Ob die Übertragung tatsächlich im Dialysezentrum erfolgt, könnte durch eine Sequenzierung von GBV-C bei allen Virusträgern innerhalb eines Zentrums abgeklärt werden.

Dazu existiert eine Untersuchung aus Belgien, in der ein Nukleotidfragment von GBV-C in 12 Dialysepatienten mit positivem GBV-C-RNA-Befund aus zwei belgischen Dialysezentren amplifiziert und sequenziert wurde. Das Fragment mit 592 Nukleotiden erstreckt sich von der 5'NCR Region bis zu einem Teil des E1 Gens. Zwei GBV-C-Isolate in zwei Dialysepatienten waren sich so ähnlich, daß eine nosokomiale Übertragung anzunehmen ist. Bei den anderen zehn Isolaten war es unwahrscheinlich, daß sie von einer gemeinsamen Quelle stammten. In dieser Studie konnte zwar eine Übertragung in belgischen Dialysezentren beobachtet werden, aber für die Mehrzahl der Infektionen konnte eine Übertragung im Dialysezentrum nicht verantwortlich gemacht werden [Liu et al., 1998].

Trotz dieses Ergebnisses sind wir aufgrund der höheren Inzidenz bei Dialysepatienten und der deutlich höheren Prävalenz bei nicht transfundierten Dialysepatienten und bei medizinischem Personal von Dialysepatienten, bzw. Nierentransplantierten der Meinung, daß es wahrscheinlich zu einer Übertragung während der Dialyse kommt. Möglicherweise variiert der Hygienestatus in den einzelnen Dialysezentren sehr stark, so daß es in einigen Zentren zu Übertragungen kommt und in anderen nicht.

Da GBV-C wahrscheinlich nicht pathogen ist, sind bisher noch keine großen Probleme aufgetreten. Würden pathogene Viren mit ähnlich leichter Übertragbarkeit wie GBV-C auftreten, müßte mit größeren Schwierigkeiten gerechnet werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Infektionsverlauf sowie die Neuinfektionsrate von GBV-Virus Typ C (GBV-C) untersucht. GBV-C ist ein parenteral übertragbares, wahrscheinlich nicht pathogenes Virus, das der Familie Flaviviridae zugeordnet wird. Der Nachweis von GBV-C-RNA zeigt eine bestehende, der Nachweis von E2-Antikörpern eine frühere Infektion an. Für unsere Nachuntersuchung testeten wir 200 Dialysepatienten mit bekanntem GBV-C-Infektionsstatus in einem Untersuchungsabstand von 2 ½ Jahren erneut auf GBV-C-RNA mittels RT-PCR und auf GBV-C-E2-Antikörper mittels ELISA. Von den 200 Patienten hatten 85 in der Vorstudie eine GBV-C-Infektion, davon 38 eine bestehende (darunter fünf mit gleichzeitig vorhandenen E2-Antikörpern) und 47 eine frühere GBV-C-Infektion, und 115 keine GBV-C-Infektion.

Acht der 33 Patienten mit ehemals GBV-C-Virämie ohne E2-Antikörper und alle fünf Patienten mit GBV-C-Virämie mit E2-Antikörpern haben ihre Virämie verloren. Wir schätzen die durchschnittliche Virämiedauer auf über fünf Jahre. Eine GBV-C-Infektion verläuft demnach chronisch, kommt es aber zur E2-Antikörperbildung, verschwindet normalerweise die Virämie. Insgesamt wurde nur bei zwei von 200 Patienten im Follow-up GBV-C-RNA und E2-Antikörper gleichzeitig nachgewiesen. Eine GBV-C-Virämie und E2-Antikörper kommen also nicht längere Zeit gemeinsam vor.

Kein Patient, der E2-Antikörper zumindest auch in der Nachuntersuchung aufwies, hat sich erneut mit GBV-C infiziert. Das Vorhandensein von E2-Antikörpern, scheint einen Schutz vor Reinfektionen zu bieten.

Elf von 47 Patienten haben ihre Antikörper verloren. GBV-C-E2-Antikörper persistieren demnach normalerweise nicht lebenslang. Wir schätzen die Dauer der Nachweisbarkeit von E2-Antikörpern auf über fünf Jahre.

Insgesamt haben sich mindestens neun Patienten neu mit GBV-C infiziert. Davon hatten fünf Patienten eine bestehende GBV-C-Infektion, darunter einer mit gleichzeitigem Vorhandensein von E2-Antikörpern. Vier Patienten haben ihre Virämie schon wieder überwunden und wiesen nur noch E2-Antikörper auf. Die daraus resultierende Inzidenz von 3 % ist sehr hoch. Auf der Suche nach dem Übertragungsweg von GBV-C sollte eine nosokomiale Infektion während der Dialysebehandlung, z.B. durch mangelnde Hygiene diskutiert werden. Würden pathogene Viren mit ähnlich leichter Übertragbarkeit wie GBV-C Einzug halten, wären erhebliche Probleme zu erwarten.

Schließlich konnten wir keinen Faktor unter den Merkmalen wie Alter, Geschlecht, Transfusionsstatus, Dialysedauer und HCV-Infektionsstatus ermitteln, der einen Einfluß auf die Veränderungen im GBV-C-Infektionsstatus hatte.

6 Summary

In this study the course of infection and the *de novo* infection rate of GB virus C (GBV-C) was investigated. GBV-C is a parenterally transmitted, probably not pathogenic virus that belongs to the Flaviviridae family. The presence of GBV-C-RNA indicates a current ongoing infection, the presence of GBV-C-E2 antibodies past infection. Two-hundred hemodialysis patients with a known status of GBV-C infection were followed-up after a median period of 2 ½ years. GBV-C-RNA was tested by RT-PCR and E2 antibodies by ELISA. In the original study, 85 of 200 patients had markers of GBV-C infection. 38 of which had RNA (five together with E2 antibodies), 47 had only GBV-C-E2 antibodies, and 115 had no sign of GBV-C infection.

In eight of 33 patients with only GBV-C-RNA and all five patients with GBV-C-RNA and E2 antibodies viremia disappeared during follow-up. We estimate, that the average period of viremia was longer than five years. Therefore, GBV-C infection takes a chronic course, but when patients develop E2-antibodies, infection is overcome.

During follow-up, only two patients had GBV-C-RNA and E2 antibodies simultaneously. RNA and antibodies do not exist simultaneously for extended periods.

None of the patients, that had E2 antibodies at least in the follow-up, acquired GBV-C-RNA again. The presence of E2 antibodies may indicate a protection against reinfection. Out of 47 patients, eleven lost their E2 antibodies. Therefore, GBV-C-E2 antibodies do not persist normally for life. We estimate, that E2 antibodies are demonstrable for more than five years.

At least nine patients without markers acquired GBV-C-RNA. Of those *de novo* infections five patients had a current (one simultaneously had E2 antibodies) and four patients had past GBV-C infection and only E2 antibodies were detected. The resulting incidence of 3 % is quite high. We assume, there is a patient to patient transmission of GBV-C in the hemodialysis centers, possible resulting from insufficient hygiene. We expect much greater problems if pathological viruses occur with the same transmission characteristics as GBV-C.

Finally, we did not find an indicator such as age, sex, status of transfusion, period of dialysis and status of HCV infection, which had an influence on the variation of the GBV-C infection status.

7 Literaturverzeichnis

- Alter HJ (1996a) The cloning and clinical implications of HGV and GBV-C. *N Engl J Med* 334: 1536-1537
- Alter HJ, Nakatsuij Y, Shih JW-K, Melpolder J, Kiyosawa K, Wages J, Kim J (1996b) Transfusion-associated Hepatitis G virus infection. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr.120: 34
- Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW-K, Kim JP (1997) The incidence of transfusion-associated Hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* 336: 747-754
- Alter MJ, Gallagher M, Morris TT, Moyer LA, Meeks EL, Krawczynski K, Kim JP, Margolis HS (1997) Acute non A-E hepatitis in the United States and the role of Hepatitis G virus infection. *N Engl-J Med* 335 (11): 741-746
- Belli LS, Ideo G, Sillini E (1996) Hepatitis G virus in posttransplant hepatitis. *N Engl J Med* 335 (18): 1394-1395
- Berg T, Naumann U, Fukumoto T, Bechstein WO, Neuhaus P, Lobeck H, Höhne M, Schreier E, Hopf U (1996) GB virus C infection in patients with chronic hepatitis B and C before and after liver transplantation. *Transplantation* 62 (6): 711-714
- Berg T, Müller AR, Platz KP, Höhne M, Bechstein WO, Hopf U, Wiedenmann B, Neuhaus P, Schreier E (1999) Dynamics of GB virus C viremia early after orthotopic liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C replication. *Hepatology* 29 (1): 245-249
- Bhardwaj B, Qian KP, Detmer J, Mizokami M, Kolberg JA, Urdea MS, Schlauder G, Linnen JM, Kim JP, Davis GL, Lau JYN (1997) Detection of GB-virus-C/Hepatitis G virus RNA in serum by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Med Virol* 52: 92-96
- Blair CS, Davidson F, Lycett C, McDonald DM, Haydon GH, Yap PL, Hayes PC, Simmonds P, Gillon J (1998) Prevalence, incidence and clinical characteristics of hepatitis G virus/GB virus C infection in Scottish blood donors. *J Infectious Diseases* 178(6): 1779-1782
- Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH (1996) Frequent dual infections of hepatitis C virus and a recently identified Flaviviridae-like hepatitis agent in dialysis patients. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 199: 252
- Cong ME, Fried MW, Lambert S, Lopareva EN, Zhan MY, Pujol FH, Thyagarajan SP, Byun KS, Fields HA, Khudyakov YE (1999) Sequence heterogeneity within

- three different regions of the hepatitis G virus genome. *Virology* 255 (2): 250-259
- Dawson GJ, Schlauder GG, Pilot-Matias TJ, Thiele D, Leary TP, Murphy P, Rosenblatt JE, Simons JN, Martinson FEA, Gutierrez RA, Lentino JR, Pachucki C, Muerhoff AS, Widell A, Tegtmeier G, Desai S, Mushahwar IK (1996) Prevalence studies of GB virus-C infection using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Med Virol* 50:97-103
- De Filippi F, Colombo M, Rumi MG, Tradati F, Prati D, Zanella A, Mannucci PM (1997) High rates of hepatitis G virus infection in multitransfused patients with hemophilia. *Blood* 90 (11): 4634-4637
- Reverenz an Professor Friedrich Deinhardt (1996) Das Virus aus dem Froster. *Abbott Times* 1996: 31 - 33
- Desassis JF, Laperche S, Girault A, Kolko A, Bouchardeau F, Zins B, Poignet JL, Courouce AM (1999) Prevalence of present and past hepatitis G virus infection in a french haemodialysis centre. *Nephrol Dial Transplant* 14 (11): 2692-2697
- Diamantis I, Bassetti S, Erb P, Ladewig D, Gyr K, Battegay M (1997) High prevalence and coinfection rate of hepatitis G and C infections in intravenous drug addicts. *J Hepatol* 26: 794-797
- Elkayam G, Hassoba HM, Ferrell LD, Garcia-Kennedy R, Gish RG, Wright TL, Laffler T, Traylor D, Hunt G, Rosenthal P (1999) GB virus C (GBV-C/HGV) and E2 antibodies in children preliver and postliver transplant. *Pediatric Research* 45 (6): 795-798
- Feucht HH, Zöllner B, Polywka S, Knödler B, Schröter M, Nolte H, Laufs R (1997) Prevalence of hepatitis G viraemia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *J Clin Microbiol* 35 (3): 767-768
- Fried MW, Khudyakov YE, Smallwood GA, Cong M, Nichols B, Diaz E, Siefert P, Gutekunst K, Gordon RD, Boyer TD, Fields HA (1997) Hepatitis G virus co-infection in liver transplantation recipients with chronic hepatitis C and nonviral chronic liver disease. *Hepatology* 25 (5): 1271-1275
- Gärtner BC, Kaul H, Neutzling AG, Sauter M, Müller-Lantzsch N, Köhler H (1999) High prevalence of hepatitis G virus (HGV) infections in dialysis staff. *Nephrol Dial Transplant* 14 (2): 406-408
- Guilera M, Saiz JC, Lopez-Labrador FX, Olmedo E, Ampurdanes S, Forns X, Bruix J, Pares A, Sanchez-Tapias JM, Jimenez-de-Anta MT, Rodes J (1998) Hepatitis G virus infection in chronic liver disease. *Gut*. 42 (1):107-111
- Haagsma EB, Cuypers HTM, Gouw ASH, Sjerps MC, Huizenga JR, Sloof MJH, Jansen PLM (1997) High prevalence of hepatitis G virus after liver

- transplantation without apparent influence on long-term graft function. *J Hepatol* 26: 921-925
- Hassoba HM, Terrault NA, el-Gohary AM, Scheffel C, Jou C, Brackett J, Hunt J, Lou SC, Wright TL (1997) Antibody to GBV-C second envelope glycoprotein (anti-GBV-C E2): is it a marker for immunity? *J Med Virol* 53 (4): 354-360
- Haydon GH, Jarvis LM, Simpson KJ, Hayes PC, Simmonds P (1997) The clinical significance of the detection of hepatitis GBV-C RNA in the serum of patients with fulminant, presumed viral, hepatitis. *J Viral Hepatitis* 4: 45-49
- Heringlake S (1996a) GBV-C/HGV in Hannover. Abbott Diagnostic Outcome Symposium (Mainz) 15.10.1996
- Heringlake S, Tillmann HL, Cordes-Temme P, Trautwein C, Hunsmann G, Manns MP (1996b) GBV-C/ HGV is not the major cause of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 25: 980-984
- Heuft HG, Berg T, Schreier E, Kunkel U, Tacke M, Schwella N, Hopf U, Salama A, Huhn D (1998) Epidemiological and clinical aspects of hepatitis G virus infection in blood donors and immunocompromised recipients of HGV-contaminated blood. *Vox Sang* 74 (3): 161-167
- Hwang SJ, Lu RH, Chan CY, Chang FY, Lee SD (1999) Detection of antibodies to E2-protein of GB virus-C/hepatitis G virus in patients with acute posttransfusion hepatitis. *J Med Virol*. 57 (1): 85-89
- Ibanez A, Gimenez-Barcons M, Tajahuerce A, Tural C, Sirera G, Clotet B. Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Martinez MA, Saiz JC (1998) Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) and hepatitis C virus among patients infected with human immunodeficiency virus: Evidence of GBV-C/HGV sexual transmission. *J Med Virol* 55 (4): 293-299
- Isaacson AH, Bhardwaj B, Qian K, Davis GL, Kato T, Mizokami M, Lau JYN (1999) Hepatitis G virus infection in renal transplant recipients. *J of Viral Hepatitis* 6 (2): 151-160
- Kao JH, Chen PJ, Hsiang SC, Chen W, Chen DS (1996) Phylogenetic analysis of GB virus-C isolates in Taiwan. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 216: 256
- Kao JH, Chen PJ, Hsiang SC, Lai MY, Chen DS (1997) Amplifikation of GB virus-C/hepatitis G virus RNA with primers from different regions of the viral genome. *J Med Virol* 51:284-289
- Karayiannis P, Lu Q, Mc Garvey MJ, Thomas HC (1996) Expression of hepatitis GBV-C structural polypeptides immunogenicity in the Tamarin animal model. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 234: 261

- Karayiannis P, Hadzyannis SJ, Kim J, Pickering JM, Piatak M, Hess G, Yun A, McGarvey MJ, Wages J, Thomas HC (1997) Hepatitis G virus infection: clinical characteristics and response to interferon. *J Viral Hepatitis* 4: 37-44
- Karayiannis P, Pickering J, Zampino R, Thomas HC (1998) Natural history and molecular biology of hepatitis G virus GB virus C. *Clin Diagn Virol* 10 (2-3): 103-111
- Kim JP, Fry KE (1997) Molecular characterization of the hepatitis G virus. *J Viral Hepatitis* 4:77-79
- Klingelhöfer I (1998) GB-Virus-Typ C-Infektionen bei Dialysepatienten in Deutschland. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Kondo Y, Mizokami M, Nakano T, Kato T, Ohba K, Orito E, Ueda R, Mukaide M, Hikiji K, Oyunsuren T, Cooksley WG (1997) Genotype of GB virus C hepatitis G virus by molecular evolutionary analysis. *Virus Research* 52 (2): 221-230
- Kunkel U, Höhne M, Berg T, Hopf U, Kekule AS, Frosner G, Pauli G, Schreier E (1998) Quality control study on the performance of GB virus C/hepatitis G virus PCR. *J Hepatol* 28 (6): 978-984
- Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, Montes CC, Buijk SL, Mushahwar ME, Carinato ME, Dawson GJ, Desai SM (1996a) Molecular diagnostic assays for the detection of GB virus infection. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr.114: 33
- Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, Schlauder GG, Dawson GJ, Desai SM, Mushahwar IK (1996b) Consensus oligonucleotide primers for the detection of GB virus C in human cryptogenic hepatitis. *J Virol Methods* 56 (1): 119-121
- Lendeckel S (2000) Hepatitis-C-Virus-Infektion bei Dialysepatienten in der Bundesrepublik Deutschland. Dissertation Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Leon R, Dawson G, Jeffers L, Reddy R, Kuhns M, De Mediana M, Bernstein D, Idrovo V, Schiff E (1996) GBV-C virus infection in patients with acute and chronic liver disease of unknown etiology. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 232: 260
- Lim MY, Fry K, Yun A, Chong S, Linnen J, Fung K, Kim JP (1997) Sequence variation and phylogenetic analysis of envelope glycoprotein of hepatitis G virus. *J Gen Virol* 78 (Pt 11): 2771-2777
- Linnen J, Wages Jr.J, Zhang-Keck Z-Y, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyanis S, Karayiannis P, Fung, K, Nakatsuji YJ, Shih

- W-K, Young, L, Piatak Jr.M, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou, J-C, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fount SKH, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion- transmissible agent. *Science* 271: 505 - 508
- Liu HF, Cornu C, Jadoul M, Dahan K, Loute G, Goubau P (1998) Molecular analysis of GB Virus C isolates in belgian hemodialysis patients. *J Med Virol* 55 (2): 118-122
- Lopez-Alcorocho JM, Castillo I, Tomas JF, Carreno V (1999) Identification of a novel GB type C virus/hepatitis G virus subtype in patients with hematologic malignancies. *J Med Virol* 57 (1): 80-84
- Mantero G, Porta F, Rossi G, Primi D (1996) GBV-C detection in severe aplastic anaemia patients. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 222: 257
- Masuko K, Mitsui T, Iwano K, Yamazaki C, Okuda K, Meguro T, Murayama N, Inoue T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M (1996) Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 334: 1485-1490
- Meyers G and Thiel HJ (1996) Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Research* 47: 53-118
- Michel G (1996) Fortschritte in der Erforschung des GBV-C-Virus. *Abbott Times*: 16-19
- Mishiro S, Okamoto H (1996) New HCV-like agent: epidemiology in Japan and characterization of the viral genome. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 117: 34
- Moaven L, Angus P, Bowden DS, Kim J, Mc Caw R, Revelle P, Locarnini SA (1996a) Hepatitis G virus is not the cause of non A-E fulminant hepatitis. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr.195: 251
- Moaven L, Angus P, Bowden DS, Kim J, Wages J, Yun A, McCaw R, Revill P, Locarnini SA (1996b) No apparent association of hepatitis G virus with non A-E fulminant hepatitis in a small cohort study. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr.210: 255
- Modrow S, Falke D (1997) *Molekulare Virologie*. Spektrum, Akad. Verl. S. 142-149
- Mosley JW, Kim JP, Dawson GF, Aach RD, Hollinger FB, Stevens CE, Barbosa LH, Nemo GF, Nowicki MJ (1996) HGV/GBV-C cases among blood recipients and controls. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996 Abstr. 123: 35

- Muerhoff AS, Simon JN, Leary TP, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, Carinato ME, Dawson GJ, Desai SM, Mushawar IK (1996) Identification of conserved sequences of the 5' terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996 Abstr. 218: 256
- Muerhoff AS, Smith DB, Leary TP, Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK (1997) Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of 5'-untranslated and coding region sequences. *J Virol* 71 (11): 8952
- Mukaide M, Mizokami M, Orito E, Ohba K, Nakano T, Ueda R, Hikiji K, Iino S, Shapiro S, Lahat N, Park YM, Kim BS, Oyunsuren T, Rezieg M, AlAhdal MN, Lau JYN (1997) Three different GB virus C/hepatitis G virus genotypes – Phylogenetic analysis and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *Febs-Letters* 407 (1): 51-58
- Naito H, Win KM, Abe K (1999) Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in southeast Asia. *J Clin Microbiol* 37 (4): 1217-1220
- Newton CR, Graham A (1994) PCR. *Spektrum, Akad. Verl.* S. 23
- Okamoto H, Nakao H, Inoue T, Fukuda M, Kishimoto J, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M (1997) The entire nucleotide sequences of two GB virus C/hepatitis G virus isolates of distinct genotypes from Japan. *J Gen Virol* 78: 737-745
- Panda SK, Panigrahi AK, Dasarathy S, Acharya SK (1996) Hepatitis G virus in India. *Lancet* 348: 1319
- Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J, Kolberg J, Collins M, Hassoba HM, Wright TL (1998) Quantitation of hepatitis G and C virus in the liver: evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology* 27 (3): 877-880
- Petrik J, Guella L, Wight DG, Pearson GM, Hinton J, Parker H, Allain JP, Alexander GJ (1998) Hepatic histology in hepatitis C virus carriers coinfectd with hepatitis G virus. *Gut* 42 (1):103-106
- Pilot-Matias TJ, Carrick RJ, Coleman PF, Leary TP, Surowy TK, Simons JN, Muerhoff AS, Buijk SL, Chalmers ML, Dawson GJ, Desai SM, Mushahwar IK (1996) Expression of the GB virus C E2 glycoprotein using the Semliki Forest virus vector system and its utility as a serologic marker. *Virology* 225 (2): 282-292
- Prati D, Capelli C, Zanella A, Bosoni P, De-Mattei C, Mozzi F, Donato MF, Colombo M, Milani S, Sirchia G (1997) Asymptomatic hepatitis G virus infection in blood donors. *Transfusion* 37 (11-12): 1200-1204
- Prati D, Zanella A, Bosoni P, Rebulli P, Farma E, DeMattei C, Capelli C, Mozzi F, Gallisai D, Magnano C, Melevendi C, Sirchia G (1998) The incidence and

- natural course of a transfusion-associated GB virus C/hepatitis G virus infection in a cohort of thalassemic patients. *Blood* 91 (3): 774-777
- Quarleri JF, Oubina JR (1997) A proposed rapid method for genomic characterization of GBV-C hepatitis G virus (HGV). *Medicina Buenos Aires* 57 (6): 717-719
- Rambusch EG, Wedemeyer H, Tillmann HL, Heringlake S, Manns MP (1998) Significance of coinfection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C – a review of the literature. *Z Gastroenterol* 36 (1): 41-53
- Robert Koch Institut (1996) RKI untersucht deutsche Drogenabhängige auf Hepatitis-G-Virus. *Pressemitteilung* 4/96
- Robertson B, Myers G, Howard C, Bretin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin-i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A (1998) Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *Arch Virol* 143 (12): 2493-2503
- Saiz JC, Ampurdanes S, Olmedo E, Lopez-Labrador FX, Forns X, Guilera M, Tassies D, Costa J, Sanchez-Tapias JM., Jimenez de Anta MT, Rodes J (1997) Hepatitis G virus infection in chronic hepatitis C: frequency, features and response to interferon. *J Hepatol* 26: 787-793
- Sarrazin C, Roth WK, Zeuzem S (1997) Heterosexual transmission of GB virus-C/hepatitis G virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9 (11): 1117-1120
- Sathar MA, Soni PN, Pegoraro R, Simmonds P, Smith DB, Dhillon AP, Dusheiko GM (1999) A new variant of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) from South Africa. *Virus Research* 64 (2): 151-160
- Sauleda S, Esteban JI, Hernandez JM, Reesink H, Castella D, Quer J, Hess G, Esteban R, Guardia J (1999a) Evaluation of RNA and E2 antibodies in prospectively followed recipients of hepatitis G virus-infected blood. *Transfusion* 39 (6): 633-638
- Sauleda S, Reesink HJ, Esteban JI, Hess G, Esteban R, Guardia J (1999b) Profiles of GBV-C/hepatitis G virus markers in patients coinfectd with hepatitis C virus. *J Med Virol* 59 (1): 45-51
- Sawayama Y, Hayashi J, Etoh Y, Urabe H, Minami K, Kashiwagi S (1999) Heterosexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus infection to non-intravenous drug-using female prostitutes in Fukuoka, Japan. *Digestive Diseases and Sciences* 44 (10): 1937-1943
- Scallan MF, Clutterbuck D, Jarvis LM, Scott GR, Simmonds P (1998) Sexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus. *J Med Virol* 55: 203-208

- Schlüter V, Schmolke S, Stark K, Hess G, Ofenloch-Haehnle B, Engel AM (1996) Reverse transcription-PCR detection of hepatitis G virus. *J Clin Microbiol* 34 (11): 2260-2264
- Schmidt B, Korn K, Fleckenstein B (1996) Molecular evidence for transmission of hepatitis G virus by blood transfusion. *Lancet* 347: 909
- Schreier E, Höhne M, Künkel U, Spielmeier M, Berg T Hopf U (1996a) Prävalenz und Sequenzvariabilität des GBV-C/ Hepatitis-G-Virus in i.v. Drogenabhängigen in Deutschland. Robert Koch Institut, Pressemitteilung: P260
- Seifried E, Bialleck H, Weber H, Waschg D, Marx S, Tschauder S, Roth (1998) Die Prävalenz des GB-Virus/ Hepatitis-G-Virus und seine Übertragung auf Empfänger. In: Scharrer I, Schramm W (Herausgeber): 27. Hämophilie-Symposium Hamburg 1996, Springer Verlag Berlin 1998: 54-60
- Sheng L, Widyastuti A, Kosala H, Donck J, Vanrenterghem Y, Setijoso E, Soumillion A, Verslype C, Schelstraete R, Emonds MP, Hess G, Yap SH (1998) High prevalence of hepatitis G virus infection compared with hepatitis C virus infection in patients undergoing chronic hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 31 (2): 366-368
- Silini E, Belli L, Alberti AB, Asti M Cerino A, Bissolati M, Rondinara G, DeCarlis L, Forti D, Mondelli MU, Ideo G (1998) HGV/GBV-C infection in liver transplant recipients: Antibodies to the viral E2 envelope glycoprotein protect from de novo infection. *J of Hepatology* 29 (4): 533-540
- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar I (1995) Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine* 1: 564-569
- Simons JN, Muerhoff AS, Leary TP, Pilot-Matias TJ, Carinato ME, Chalmers ML, Erker JC, Dawson GJ, Lemon SM, Desai SM, Mushahwar IK (1996a) Evidence for the Existence of Internal Ribosome Entry Sites in the 5' Ends of GB Viruses. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 233: 260
- Simons JN, Desai SM, Mushahwar IK (1996b) The GB Viruses: Isolation, Characterization, Diagnosis and Epidemiology. *Viral Hepatitis Rev* 2 (4): 229-246
- Stark K, Doering CD, Bienzle U, Pauli G, Hamouda O, Engel AM, Schreier E (1999) Risk and clearance of GB virus C/hepatitis G virus infection in homosexual men: A longitudinal study. *J Med Virol* 59 (3): 303-306
- Sugai Y, Nakayama H, Fukuda M, Sawada N, Tanaka T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M (1997) Infection with GB virus C in patients with chronic liver disease. *J Med Virol* 51: 175-181

- Tacke M, Kiyosawa K, Stark K, Schlüter V, Ofenloch-Hähnle B, Hess G, Engel AM (1997) Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 349: 318-320
- Tacke M, Schmolke S, Schlueter V, Sauleda S, Esteban JI, Tanaka E, Kiyosawa K, Alter HJ, Schmitt U, Hess G, Ofenloch-Hähnle B, Engel AM (1997) Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology* 26 (6): 1626-1633
- Tagariello G, Infantolino D, Biasin MR, Davoli PG, Traldi A (1996) Hepatitis G viral RNA in Italian haemophiliacs with and without hepatitis C infection. *Lancet* 348: 760-761
- Takahashi K, Hijikata M, Hino K, Mishiro S (1997) Entire polyprotein-ORF sequences of Japanese GBV-C/HGV isolates: Implications for new genotypes. *Hepatology Research* 8 (2): 139-148
- Tanaka E, Kiyosawa K, Shimoda K, Hino K, Tacke M, Schmolke S, Engel AM, Hess G (1998) Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J Viral Hepatitis* 5 (3): 153-159
- Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, Hunt JC, Marshall R, Astemborski J, Nelson KE (1998) Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis* 177 (3): 539-542
- Thomas HC, Pickering J, Karayiannis P (1997) Identification, prevalence and aspects of molecular biology of hepatitis G virus. *J Viral Hepat* 4 Suppl 1: 51-54
- Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, Kratochvil J, Hunt J, Qiu XX, Lou SC, Pichlmayr R, Manns MP (1998) Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology* 28 (2): 379-384
- Viazov S, Riffelmann M, Khoudyakov Y, Fields H, Varenholz C, Roggendorf M (1997a) Genetic heterogeneity of hepatitis G virus isolates from different parts of the world. *J Gen Virol* 78 (Pt3):577-581
- Viazov S, Riffelmann M, Sarr S, Ballauff A, Meisel H, Roggendorf M (1997b) Transmission of GBV-C/HGV from drug-addicted mothers to their babies. *J Hepatol* 27: 85-90
- Wang Y, Chen H-S, Fan M-H, Liu H-L, An P, Sawada N, Tanaka T, Tsuda F, Okamoto H (1997) Infection with GB virus C and hepatitis C virus in hemodialysis patients and blood donors in Beijing. *J Med Virol* 52: 26-30

- Wölfle J, Berg T, Keller KM, Schreier E, Lentze MJ (1998) Persistent hepatitis G virus infection after neonatal transfusion. *J Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 26 (4): 402-407
- Wu JC, Sheng WY, Huang SJ, Lee S-D (1997) Prevalence and risk factor analysis of GBV-C/HGV infection in prostitutes. *J Med Virol* 52: 83-85
- Xiang J, Klinzmann D, McLinden J, Schmidt WN, LABrecque DR, Gish R (1998) Characterization of hepatitis G (GB-C Virus) particles: Evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol* 72 (4): 2738-2744
- Yoshikawa A, Iizuka H, Miyamoto H, Iwata A, Mayumi M, Kosaki N (1996) Detection of hepatitis GB virus C sequence by semi-nested PCR in Japanese blood donors. *Transfusion*, 3/4C-01 OP: 147
- Zampino R, Pickering J, Iqbal M, Gaud U, Thomas HC, Karayiannis P (1999) Hepatitis G virus/GBV-C persistence: absence of hypervariable E2 region and genetic analysis of viral quasispecies in serum and lymphocytes. *J Viral Hepatitis* 6 (3): 209-218
- Zanella I, Bettinardi A, Carlino, Fiordalisi G, Paraninfo G, Stellini R, Primi D (1996) Analysis of the sequence variability of a partial region of GBV-C virus in patients with non A-E hepatitis in Italy. IX. Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Rom 21.-25.4.1996, Abstr. 214: 255
- Zanetti AR, Tanzi E, Romano L, Principi N, Zuin G, Minola E, Zapparoli B, Palmieri M, Marini A, Ghisotti D, Friedman P, Hunt J, Laffler T (1998) Multicenter trial on mother-to-infant transmission of GBV-C virus. *J Med Virol* 54 (2):107-112
- Zuckerman, AJ (1995) The new GB hepatitis viruses. *Lancet* 345: 1453-1454

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. W. Gerlich für die Überlassung des Themas und für die stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen zu vertreten und für die gründliche Durchsicht dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. G. Caspari für die engagierte, persönliche Betreuung der praktischen und vor allem der theoretischen Arbeit.

Frau Dr. I. Klingelhöfer danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der PCR und der Antikörpertestung, für die Bereitstellung ihrer Ergebnisse und Patientendaten und für die jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bei all meinen Fragen.

Mein Dank gilt auch der Firma Boehringer Mannheim für die Überlassung des Untersuchungsmaterials; im besonderen danke ich Herrn Dr. V. Schlüter für die Materialien der HGV-PCR und Herrn Dr. U. Schmidt für die Materialien der Antikörpertestung.

Ein Dankeschön ist auch an alle Mitarbeiter des Institutes der Medizinischen Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gerichtet, die mich jederzeit unterstützt haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Tomas, aber auch meinen Freunden für ihr Verständnis und Entgegenkommen. Besonders herzlich danke ich meiner Mutter, deren Hilfe mir die Anfertigung dieser Dissertation überhaupt erst ermöglichte.